



DIPLOMARBEIT

Frau
Josefine Müller

**Etablierung einer Methodik
zur Detektion und
Quantifizierung von
anaeroben Bakterien in Rein-
und Mischkulturen und deren
Anwendung zum Monitoring
von Anreicherungen**

2011

DIPLOMARBEIT

Etablierung einer Methodik zur Detektion und Quantifizierung von anaeroben Bakterien in Rein- und Mischkulturen und deren Anwendung zum Monitoring von Anreicherungen

Autor:

Josefine Müller

Studiengang:
Umwelttechnik/Biotechnologie

Seminargruppe:
UT06wB1

Erstprüfer:
Frau Prof. Dr. Radehaus

Zweitprüfer:
PD Dr. Lorenz Adrian

Mittweida, März 2011

Bibliografische Angaben:

Müller, Josefine:

Etablierung einer Methodik zur Detektion und Quantifizierung von anaeroben Bakterien in Rein- und Mischkulturen und deren Anwendung zum Monitoring von Anreicherungen – 2011. – 73 S.

Mittweida, Hochschule Mittweida, University of Applied Sciences,
Fakultät Mathematik/Naturwissenschaften/Informatik, Diplomarbeit, 2011

Referat:

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Entwicklung von Verfahren zur Detektion und Quantifizierung von anaeroben Bakterien. Eine Methode zur Zellzählung mittels Fluoreszenzmikroskopie in Reinkulturen wurde modifiziert und anschließend zur Bestimmung des optimalen Zellaufkonzentrierungsverfahrens für das Bakterium CBDB1 benutzt. Des Weiteren wurde ein quantitativer Real Time PCR-Versuchsansatzes entworfen, welcher es ermöglicht das relative Vorhandensein der den *Dehalococcoides* zugehörigen *Chloroflexi*, einer noch weitestgehend unerforschten Bakteriengruppe in Sedimenten zu bestimmen.

Danksagung

An dieser Stelle bedanke ich mich ganz herzlich bei all den Menschen, die mich beim Erstellen dieser Arbeit tatkräftig unterstützt haben.

Allen voran möchte ich mich besonders bei Herrn PD Dr. Lorenz Adrian für das Angebot bedanken, meine Arbeit in seiner Arbeitsgruppe durchführen zu dürfen. Ich danke ihm für die sehr gute Betreuung während der gesamten Diplomarbeitszeit, in der er mir mit zahlreichen Hinweisen, Ratschlägen und Hilfestellungen in der Experimentier- und Schreibphase zur Seite stand. Besonders möchte ich ihm dabei für das geduldige Lesen und seine vielen konstruktiven Kommentare bedanken, welche maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Während der Zeit in seiner Arbeitsgruppe habe ich sehr viel gelernt und viele hilfreiche Erfahrungen gesammelt.

Ich danke Frau Professor Radehaus herzlichst für die Übernahme der Betreuung meiner Arbeit seitens der Hochschule Mittweida.

Mein Dank gilt außerdem allen Mitarbeitern des Departments Isotopenbiogeochemie, insbesondere Dr. Kenneth Wasmund für die gute Zusammenarbeit im Labor, die geduldige Beantwortung fachlicher Fragen, sowie die Betreuung beim Umgang mit der qPCR-Maschine. Auch für die Durchsicht all meiner englischsprachigen Arbeiten und für seine wertvollen Hinweise diesbezüglich möchte ich ihm danken. Ein besonderer Dank geht ebenfalls an Benjamin Scheer, danke für die Einweisungen in die verschiedenen Laborarbeiten und dass du mir deine Kulturen für meine Untersuchungen zur Verfügung gestellt hast. Ich danke dir für jegliche praktische Unterstützung bei der Durchführung meiner Experimente. Ich konnte immer mit deiner Hilfe rechnen.

Mein Dank geht außerdem an Jessica Lehmann und Christina Lachmann für die Zusammenarbeit im Labor und die mentale Unterstützung. Danke Jessica, dass du immer ein offenes Ohr für mich hattest, sei es in privaten oder fachlichen Angelegenheiten. Und einen riesigen Dank für all die Schokolade, welche meine Motivation besonders während der Schreibphase gesteigert hat. Ich danke auch Dr. Ernest Marco Urrea, Camelia Algora und Hoa-Duan Tran für die gute Laune im Labor und die familiäre Arbeitsatmosphäre.

Ich danke außerdem Myriel Cooper und Bernd Krostitz für die Betreuung und Hilfe bei den Laborarbeiten, welche ich an der TU-Berlin durchführen durfte, sowie Ute Lechner und Marlen Poeritz für die Betreuung meiner Arbeiten in Halle.

Ein Dank geht auch an meine Mitbewohner und Freunde für die seelische Unterstützung und die vielen gemeinsamen Stunden außerhalb der Arbeit. Ich danke Luisa Kunath und Lucy Stark für ihre langjährige Freundschaft und das Korrekturlesen.

Ein besonderer Dank gilt meinen Geschwistern Julia und Tom Müller, danke für all die schönen gemeinsamen Stunden, dass ihr immer an mich geglaubt habt und mir psychische Stärke vermittelt habt.

Doch mein größter Dank gilt meinen Eltern, Carmen Müller und Ulrich Mehner, die mich all die Jahre tatkräftig und liebevoll unterstützt haben, meinen Plänen und Wünschen gegenüber immer offen waren und mir alles in ihrer Macht stehende ermöglicht haben. Ihr seid mir sehr wichtig! Ich danke ebenfalls meinen Großeltern Erhard und Lina Christine Linke für all die Liebe, Geborgenheit und finanzielle Unterstützung in all den Jahren. Danke auch dir, Brunhilde Linke, für die Unterstützung im letzten Jahr.

Inhaltverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	IX
Formelverzeichnis	XI
Abkürzungsverzeichnis	XIII

1 Einleitung..... 1

1.1 Die Gattung der <i>Dehalococcoides</i>	1
1.1.1 Morphologie und Eigenschaften	1
1.1.2 Vorkommen und Verteilung	2
1.2 Grundlagen der Fluoreszenzmikroskopie.....	3
1.2.1 Einführung zur Mikroskopie	3
1.2.2 Das Prinzip der Fluoreszenz.....	3
1.2.3 Aufbau und Funktionsweise des Epifluoreszenzmikroskops	5
1.3 Trennverfahren zur Zellgewinnung.....	6
1.4 Ziel der Arbeit	8
1.5 Molekularbiologische Vorarbeiten	10
1.5.1 Herkunft der bakteriellen Mischkulturen und Sedimentproben	10
1.5.2 Herstellung der Standards für die qPCR	11
1.5.3 Design und Tests der Primer zur Bestimmung der DRC	11

2 Material und Methoden..... 13

2.1 verwendete Materialien	13
2.1.1 Chemikalien	13
2.1.2 verwendete Lösungen	13
2.1.3 Herstellung des Standard-Zeltmedium für CBDB1-Kulturen	15
2.2 Mikroskopische Zellzählungen	16
2.2.1 Herstellung von mit Agarose beschichteten Objektträger.....	16
2.2.2 Zellzahlbestimmung mittels Fluoreszenzmikroskopie.....	17
2.3 angewandte Trennverfahren	18
2.3.1 Zentrifugation.....	18
2.3.2 Filtration	19
2.3.3 Vakuumdestillation.....	20
2.4 Die quantitative Real Time PCR (qPCR).....	20
2.4.1 Durchführung der qPCR	20

2.4.2	Allgemeine Darstellung und Auswertung der Ergebnisse einer qPCR	23
2.5	Agarosegelelektrophorese	27
2.6	DNA-Isolierung aus Reinkulturen und Sedimentproben.....	27
2.7	Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration einer Probe	28
3	Ergebnisse	31
3.1	Detektion und Quantifizierung von CBDB1 mittels Fluoreszenzmikroskopie ..	31
3.1.1	Die Methode der Zellzahlbestimmung	31
3.1.2	Anwendungen der Zählmethode zum Monitoring von Anreicherungen	33
3.1.2.1	Zentrifugation.....	33
3.1.2.2	Filtration.....	36
3.1.2.3	Vakuumdestillation	39
3.2	Detektion und Quantifizierung von DRC in Sedimenten mittels qPCR	41
3.2.1	Verwendete CBDB1-Kontroll-DNA	41
3.2.2	Bestimmung der optimalen Anlagerungstemperatur der Primerpaare	42
3.2.3	Bestimmung der optimalen Einsatzkonzentration der Primer.....	42
3.2.3.1	Bestimmung der optimalen Konzentration der Bakterienprimer	43
3.2.3.2	Bestimmung der optimalen DRC-Primerkonzentration.....	45
3.2.4	Ermittlung der optimalen Zusammensetzung des Reaktionsansatzes	48
3.2.5	Ermittlung der optimalen durchzuführenden Zyklenzahl	49
3.2.6	Ermittlung der optimalen Verdünnungen der aus marinen Sedimenten extrahierten DNA.....	52
3.2.7	Verhältnis von DRC zur Gesamtbakterienzahl in verschiedenen Sedimenten	53
3.2.8	Betrachtung der Amplifikationseffizienzen und Schmelzkurven	56
4	Diskussion	59
4.1	Einschätzung der Anwendbarkeit des modifizierten fluoreszenzmikroskopischen Zählverfahren zur Zellkonzentrationsbestimmung in Reinkulturen	59
4.2	Abschätzung der Eignung der angewendeten Trennverfahren zur Aufkonzentrierung und Ernte von CBDB1-Zellen aus Reinkulturen.....	61
4.3	Einschätzung der einzelnen Optimierungsschritte zur Etablierung der qPCR- Methodik.....	64
4.4	Einschätzung der Anwendbarkeit der etablierten qPCR-Methodik zur Bestimmung des relativen Gehaltes an DRC.....	66

4.5	Gegenüberstellung der in dieser Arbeit etablierten und modifizierten Detektions- und Quantifizierungsverfahren	68
5	Zusammenfassung und Ausblick.....	71
	Summary	73
	Anlagen	XV
	Anhang 1	XV
	Anhang 2	XVI
	Literaturverzeichnis	XXV

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Übersicht verschiedener Filtrationsverfahren (ACTEW Corporation Ltd)	8
Abb. 2: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Polyethylenfiltermembran (Köpp, Oliver).....	8
Abb. 3: Aufbau des Optiphot-2 der Firma Nikon (Mikroskop Begleitheft)	17
Abb. 4: Aufbau des Vakuumverdampfers	20
Abb. 5: Amplifikationskurven einer Standardreihe (von links nach rechts: 1×10^7 bis 1×10^2 Kopien/ μ l), welche jeweils in zwei parallelen Ansätzen mittels der DRC-Primer generiert wurden.....	25
Abb. 6: Standardkurve welche durch Amplifikation der Standards 1×10^7 bis 100 Kopien/ μ l mit den DRC-Primern generiert wurde. Die absolute Anzahl des <i>Template</i> in der ursprünglichen Probe ist über den Schwellenwertzyklus (Ct-Wert) aufgetragen.	25
Abb. 7: Während der Schmelzkurvenanalyse detektiertes Fluoreszenzsignal einer mittels DRC-Primern amplifizierten 10^7 Kopien/ μ l Standardprobe.	26
Abb. 8: Schmelzkurve einer mittels DRC-Primern amplifizierten 10^7 Kopien/ μ l Standardprobe.	26
Abb. 9: Zellzahlen der verschiedenen Verdünnungsproben einer aufkonzentrierten CBDB1-Kultur. Jeder blaue Balken stellt den Mittelwert und jeder schwarze Balken die Standardabweichung für jeweils 10 aufgenommene Bilder dar.	32
Abb. 10: Zellzahlen der Verdünnungsproben. R^2 : linearer Korrelationskoeffizient.	33
Abb. 11: Zellkonzentration je zurückgespülter Milliliter. Die Balken 0 a-c symbolisieren die Zellkonzentrationen der Ausgangskultur vor der Rückspülung. Die Zellkonzentration des sechsten Milliliters, mit welchem der Filter gespült wurde, lag unterhalb der Detektionsgrenze der Zählmethode, ebenso wie die des Filtrates.	37
Abb. 12: Von links nach rechts: gefilterte Zellkultur, aerob gewordenes Zellkonzentrat, anaerobes Zellkonzentrat.....	40
Abb. 13: Mikroskopische Aufnahme des Zellkonzentrates vom Stamm CBDB1. Links) nach Aufkonzentrierung durch Vakuumverdampfung. Rechts) nach Aufkonzentrierung durch Filtration.	40
Abb. 14: Amplifikationsgraphen verschiedener Standards (Im Gegensatz zu den in 2.4.2 gezeigten Graphen wurde die y-Achse hier in logarithmischer Form aufgetragen). Die grünen Graphen wurden mit den universellen Bakterienprimern, die blauen mit den DCR Primern generiert. Der jeweilige linke Graph einer Farbe wurde durch die Amplifizierung des 1×10^6 Kopien/ μ l der	

jeweilige rechte durch die Amplifizierung des 1×10^5 Kopien/ μ l Standards generiert.	44
Abb. 15: Amplifikationskurven der verschiedenen Primerpaare und Primerkonzentrationen. Von links nach rechts: Bakterienprimer in der Konzentrationen von (rot: 5 μ M, dunkelgrün: 2,5 μ M, pink: 1 μ M, gelb: 0,5 μ M, dunkelblau: 0,1 μ M). Der hellgrüne Graph wurde mit 5 μ M DRC-Primern generiert. Bei einem Fluoreszenzschwellenwert von 0,377732 (blaue waagerechte Linie) lag der durchschnittliche C_t -Wert einer Doppelbestimmung für die Amplifizierung mit den 5 μ M Bakterienprimern bei 30,8 während der für die Amplifizierung mit den 1 μ M DRC-Primern 30,7 betrug.	44
Abb. 16: Schmelzkurven der qPCR-Produkte, welche mit den Bakterienprimern in den Konzentrationen (rot: 5 μ M, grün: 2,5 μ M, pink: 1 μ M, gelb: 0,5 μ M, dunkelblau: 0,1 μ M) generiert wurden.	45
Abb. 17: Amplifikationsgraphen der Standardproben (rot: 1×10^6 , gelb: 1×10^5 , hellgrün: 1×10^4 , dunkelgrün: 1×10^3 , blau: 1×10^2 Kopien/ μ l) generiert mit den 10 μ M (jeweils linker Graph einer Farbe) und 5 μ M DRC-Primern (jeweils rechter Graph einer Farbe).	46
Abb. 18: Schmelzkurven der Standardproben von 1×10^6 bis 1×10^2 Kopien/ μ l amplifiziert mit 10 μ M DRC-Primern. Es handelt sich hier um die gleichen Standardproben wie in Abb. 17 (rot: 1×10^6 , gelb: 1×10^5 , hellgrün: 1×10^4 , dunkelgrün: 1×10^3 , blau: 1×10^2 Kopien/ μ l).	46
Abb. 19: Schmelzkurven der Standardproben von 1×10^6 bis 1×10^2 Kopien/ μ l amplifiziert mit 5 μ M DRC-Primern. Es handelt sich hier um die gleichen Standardproben wie in Abb. 17 (rot: 1×10^6 , gelb: 1×10^5 , hellgrün: 1×10^4 , dunkelgrün: 1×10^3 , blau: 1×10^2 Kopien/ μ l).	47
Abb. 20: Schmelzkurven von verschiedenen CBDB1-Kontrollen in unterschiedlicher Verdünnung aufgenommen nach 42 PCR Zyklen (grün: CBDB1b-DNA (1:100), blau: CBDB1c-DNA (1:10), lila/pink: CBDB1c-DNA (1:100))	50
Abb. 21: Schmelzkurven von verschiedenen CBDB1-Kontrollen aufgenommen nach 40 PCR Zyklen (grün: CBDB1a-DNA (1:100), lila/pink (mit Doppelpeak): CBDB1b-DNA (1:100), lila/pink (ein klarer Peak) CBDB1-DNA (1:100))	51
Abb. 22: Schmelzkurven von CBDB1-Kontrollen (1:100) im Dreifachansatz aufgenommen nach 38 PCR Zyklen.	51
Abb. 23: Schmelzkurven von verschiedenen CBDB1-Kontrollen aufgenommen nach 36 PCR Zyklen (grün: CBDB1c-DNA (1:100), blau: CBDB1b-DNA (1:100), lila/pink: CBDB1-DNA (1:100)).	52
Abb. 24: prozentualer Anteil an DRC zur Gesamtbakterienzahl in Sedimenten.	54

Abb. 25: relativer Anteil an DRC zur Gesamtbakterienzahl in Sedimenten. Die blauen Balken verdeutlichen den Anteil an DRC von Set 1, die roten Balken hingegen den Anteil an DRC von Set 2.	56
Abb. 26: Mikroskopisches Bild beobachteter Zellanhäufungen	60
Abb. 27: Schmelzkurven der Standardproben amplifiziert mit den DRC-Primern jeweils im Doppelansatz	XVI
Abb. 28: Schmelzkurven der CBDB1-Kontrollen CBDB1 a-c amplifiziert mit den DRC-Primern jeweils im Doppelansatz	XVI
Abb. 29: Schmelzkurven der Nordsee Proben 7,8,9,13,15 und 18 amplifiziert mit den DRC-Primern jeweils im Doppelansatz	XVII
Abb. 30: Schmelzkurven der Neapel Probe amplifiziert mit den DRC-Primern jeweils im Doppelansatz	XVII
Abb. 31: Schmelzkurven der Chile oben Probe amplifiziert mit den DRC-Primern jeweils im Doppelansatz	XVIII
Abb. 32: Schmelzkurven der Chile unten Probe amplifiziert mit den DRC-Primern jeweils im Doppelansatz	XVIII
Abb. 33: Schmelzkurven der Irland 17 Probe amplifiziert mit den DRC-Primern jeweils im Doppelansatz	XIX
Abb. 34: Schmelzkurven der Irland 18 Probe amplifiziert mit den DRC-Primern jeweils im Doppelansatz	XIX
Abb. 35: Schmelzkurven der Standardproben amplifiziert mit den Bakterien Primern jeweils im Doppelansatz.....	XX
Abb. 36: Schmelzkurven der CBDB1-Kontrollen CBDB1 a-c amplifiziert mit den Bakterien Primern jeweils im Doppelansatz.....	XX
Abb. 37: Schmelzkurven der Nordsee Proben 7,8,9,13,15 und 18 amplifiziert mit den Bakterien Primern jeweils im Doppelansatz.....	XXI
Abb. 38: Schmelzkurven der Neapel Probe amplifiziert mit den Bakterien Primern jeweils im Doppelansatz	XXI
Abb. 39: Schmelzkurven der Chile oben Probe amplifiziert mit den Bakterien Primern jeweils im Doppelansatz.....	XXII
Abb. 40: Schmelzkurven der Chile unten Probe amplifiziert mit den Bakterien Primern jeweils im Doppelansatz.....	XXII
Abb. 41: Schmelzkurven der Irland 17 Probe amplifiziert mit den Bakterien Primern jeweils im Doppelansatz.....	XXIII
Abb. 42: Schmelzkurven der Irland 18 Probe amplifiziert mit den Bakterien Primern jeweils im Doppelansatz.....	XXIII

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Zusammensetzung der Spurenelementlösung	13
Tab. 2: Zusammensetzung der Widdellösung	14
Tab. 3: Zusammensetzung der Vitamin-7-Lösung	14
Tab. 4: Zusammensetzung des TE-Puffers	15
Tab. 5: verwendeten Spritzenvorsatzfilter	19
Tab. 6: Zusammensetzung des 20 µl Reaktionsansatzes für die qPCR	21
Tab. 7: Übersicht über die verwendeten Primerpaare für die qPCR	21
Tab. 8: Temperaturprogramm für die qPCR	23
Tab. 9: Herstellung der Verdünnungen aus dem Zellkonzentrat	31
Tab. 10: Mittelwerte und Standardabweichungen der Verdünnungsproben	32
Tab. 11: Zellkonzentrationen in den letzten beiden Millilitern eines Falcongefäßes nach der Zentrifugation.	34
Tab. 12: Im Dreifachansatz bestimmte Zellkonzentrationen in den letzten 10 ml eines Falcongefäßes nach der Zentrifugation.	34
Tab. 13: Übersicht der Zellkonzentrationen nach mehrmaliger Zentrifugation (Experiment1)	35
Tab. 14: Übersicht der Zellkonzentrationen nach mehrmaliger Zentrifugation (Experiment2)	36
Tab. 15: Zellgehalt je zurückgespültem Milliliter	37
Tab. 16: Zellgehalt der zurückgespülten Milliliter	38
Tab. 17: Zellrückhaltevermögen verschiedener Spritzenvorsatzfilter.	38
Tab. 18: Zellausbeute im zurückgespülten Retentat (z. Retentat) in Abhängigkeit des Filtermembranenmaterials	39
Tab. 19: erzielte Zellkonzentrationen in unterschiedlichen Volumina nach Anreicherung mittels Vakuumdestillation und mittels Filtration aus der gleichen Ausgangskultur.	40
Tab. 20: Adsorptionsmesswerte extrahierter CBDB1-DNA	42
Tab. 21: Übersicht der Kopienzahlen für den Einsatz von 5 µM und 1 µM DRC-Primern	48
Tab. 22: neue Zusammensetzung des 20 µl Reaktionsansatzes	49
Tab. 23: DRC-Kopienzahl der Reaktionsansätze mit 1 µl (ursprünglich) und 2 µl <i>Template</i> -DNA	49
Tab. 24: DNA Kopienzahl in den Aarhus-Sedimentextrakten für den Bakterien-und DRC-Ansatz	53

Tab. 25: DNA-Kopienzahl in den CBDB1-DNA-Extrakten für den Bakterien-und DRC-Ansatz	53
Tab. 26: Kopienzahlen der Bakterien und DRC-DNA in Sedimentextrakten	54
Tab. 27: relativer Anteil an DRC zur Gesamtbakterienzahl zweier Extraktionssets.....	55
Tab. 28: Differenz der C _t -Werte zwischen zwei amplifizierten Standardproben aus Experiment 1	57
Tab. 29: effektive Primerlänge und Anlagerungstemperatur der Primer.....	65

Formelverzeichnis

Formel 1: Berechnung der Primereffizienz.....	25
Formel 2: Bestimmung der Nukleinsäurenkonzentration	29
Formel 3: zur Berechnung der effektiven Primeranlagerungstemperatur	65

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ad	bis zu folgenden Wert auffüllen
bp	Basenpaare
c	Konzentration
C _t	Schwellenwertzyklus
CA	Celluloseacetat
DCB	Dichlorbenzol
DCE	Dichlorethen
ddH ₂ O	zweifach destilliertes Wasser, Milli-Q-Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DRC	Dehalococcoides verwandte <i>Chloroflexi</i> (<i>Dehalococcoides-related Chloroflexi</i>)
dsDNA	doppelsträngige DNA
F _a	Anreicherungsfaktor
HCB	Hexachlorbenzol
MW	Mittelwert
PCE	Perchlorethen, Tetrachlorethen
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PES	Polyethersulfon
qPCR	quantitative Real Time PCR
RNA	Ribonukleinsäure
SD	Standardabweichung
T _A	Primeranlagerungstemperatur
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TCB	Trichlorbenzol
TCE	Trichlorethen
TeCB	Tetrachlorbenzol
T _s	Schmelztemperatur
z. Retentat	zurückgewaschenes Retentat

1 Einleitung

1.1 Die Gattung der *Dehalococcoides*

1.1.1 Morphologie und Eigenschaften

Chlorierte organische Verbindungen sind in unserer Umwelt allgegenwärtig. Durch den langjährigen Einsatz in der Industrie und Landwirtschaft haben sie sich verstärkt im Boden, Grundwasserleitern und Sedimenten angehäuft. Wegen ihrer physikalischen und chemischen Eigenschaften haben sie einen schädlichen Einfluss auf eine Vielzahl von Ökosystemen und stehen im Verdacht Krebs zu erregen. Die Sanierung kontaminierter Umweltmedien stellt eine große Herausforderung dar. Es stehen zwar eine Reihe von Ex-situ-Reinigungsverfahren, wie z. B. die thermodynamische Oxidation, Adsorption an Aktivkohle, Extraktion sowie Elektroosmose zur Verfügung, diese sind allerdings mit einer Auskofferung des Bodens verknüpft und zerstören neben den Schadstoffen auch die vorherrschenden Mikroorganismen. Die In-situ Methode der Bioremediation, also die Nutzung natürlich vorkommender Organismen zur Umwandlung von Schadstoffen in unschädliche Verbindungen, stellt hingegen eine vielversprechende Reinigungsmethode dar. Hierfür sind theoretisch alle Mikroorganismen brauchbar, welche die chlorierten Verbindungen umsetzen. Praktisch am besten geeignet wären jedoch Mikroorganismen, welche ihre Energie direkt aus dem Abbau stark halogener Komponenten gewinnen. Zu diesen zählt die Bakteriengattung *Dehalococcoides*, sie gehören zur Ordnung der *Dehalococcoidetes*, welche wiederum der Klasse der *Chloroflexi* zugewiesen werden. *Dehalococcoides* sind streng anaerobe Gram-negative Bakterien. Sie halten ihren Stoffwechsel allein durch die Reduktion chlorierter Verbindungen aufrecht. Der Wasserstoff fungiert dabei als Elektronenspender während die chlorierten Verbindungen den Elektronenakzeptor darstellen. (Tas et al. 2010)

Das Enzym, welches die Dehalogenierungsreaktion katalysiert, wird als reduktive Dehalogenase bezeichnet. Von allen bekannten dechlorierenden Bakterien enthält das relativ kleine Genom der *Dehalococcoides* spp. CBDB1, 32 Gene, welche die reduktiven Dehalogenasen kodieren (Kube et al. 2005). Bislang wurden neben diesem Stamm sieben weitere isoliert. *Dehalococcoides ethenogenes* Stamm 195, *Dehalococcoides* spp. Stamm BAV1, VS, FL2, GT, DCMB5 und MB. *Dehalococcoides* haben eine unregelmäßige, kugelartige Gestalt und besitzen einen Zelldurchmesser von etwa 0,5 µm und sind 0,2 µm dick (Ahsanul Islam et al. 2010). Sie sind mesophil und kommen bei

neutralem pH-Wert und Temperaturen zwischen 25-40°C vor. Im Labor erzielte maximale Wachstumsraten der *Dehalococcoides* spp. liegen bei etwa 0,2-0,4 Bakterien. (Tas et al. 2010). Jeder der bisher isolierten Stämme bevorzugt dabei unterschiedliche chlorierte Verbindungen. *Dehalococcoides ethenogenes* Stamm 195, welcher als erstes Bakterium dieser Gattung 1997 isoliert wurde, wandelt toxisches Perchlorethen durch den Prozess der reduktiven Dechlorierung zu unschädlichem Ethen um (Maymo-Gatell et al. 1997). 2000 folgte schließlich die Isolation des Stammes CBDB1, dieser wächst auf einem rein synthetischen Medium. CBDB1 dechloriert Hexachlorbenzol, Pentachlorbenzol, alle drei Tetrachlorbenzole (1, 2, 3, 5-; 1, 2, 4, 5-; 1, 2, 3, 4-TeCB) und 1, 2, 3- und 1, 2, 4-Trichlorbenzol zu 1, 3-DCB, 1, 4-DCB und 1, 3, 5-TCB. (Adrian et al. 2000). CBDB1 stellt den ersten reinen Stamm dar, welcher nachweislich hochchlorierte Dioxine, Biphenyle und Phenole, sowie PCE zu TCE und trans-DCE (Adrian et al. 2007) umwandeln kann.

1.1.2 Vorkommen und Verteilung

Bisher wurden *Dehalococcoides* spp. vor allem in Nordamerika, Europa und Japan nachgewiesen; ihre Verteilung auf der südlichen Erdhalbkugel bedarf weiterer Untersuchungen. Aufgrund ihrer anaeroben Lebensweise findet man sie vor allem in marinen Sedimenten, kontaminierten Böden und Gewässern. Bisher durchgeführte Bioaugmentationsversuche führten zur vollständigen Umwandlung von PCE und TCE zu Ethen (Major et al. 2002). Es wurde bisher jedoch kein logischer Zusammenhang zwischen der Anzahl der in Umweltproben gefundenen 16S rRNA Kopien der *Dehalococcoides* spp. und den unter Laborbedingungen beobachteten HCB-Umwandlungsraten aufgedeckt. Das Auftreten und die Aktivität der *Dehalococcoides* spp. variiert stark je nach Gebiet oder untersuchtem Zeitraum und steht unter dem Verdacht ebenso von anderen Umweltfaktoren wie der vorherrschenden Temperatur bzw. dem Vorhandensein anderer fermentativer Bakteriengemeinschaften abhängig zu sein, (Tas et al. 2009). Um das genaue Bioremediationspotential eines Gebietes abschätzen zu können, ist es deshalb notwendig sich einen Gesamtüberblick über alle Faktoren, welche den Nährstoffeintrag und dessen Kreisläufe beeinflussen, zu verschaffen (Tas et al. 2010). Besonders der Eintrag bestimmter potentieller Elektronenakzeptoren, wie Sauerstoff und Nitrat haben einen entscheidenden Einfluss auf die vorherrschenden Bakterienpopulationen.

1.2 Grundlagen der Fluoreszenzmikroskopie

1.2.1 Einführung zur Mikroskopie

Die Mikroskopie dient der Sichtbarmachung von Objekten, dessen Größe unter dem Auflösungsvermögen des menschlichen Auges liegt. Die Auflösung bezeichnet dabei den minimalen Abstand zwischen zwei Punkten, bei dem diese gerade noch als getrennt voneinander wahrgenommen werden. Sie wird durch das Abbe Limit begrenzt und ist somit abhängig von der Wellenlänge des Lichtes und der numerischen Apertur des Objektivs und des Kondensors. Die Apertur hängt wiederum vom Akzeptanzwinkel, dem Winkel zwischen der Mittelachse und den Randstrahlen der Linse und dem Brechungsindex des Mediums zwischen Objekt und Objektiv ab. (Robenek, 1995) S.21, S.44

Es werden zwei Beleuchtungstechniken unterschieden: die Durchlicht- und Auflichtmikroskopie. Wird das Licht durch das Präparat hindurchgeleitet und darauf vom Objektiv des Mikroskops erfasst, spricht man vom Durchlichtmikroskop. Hierfür sind dünne, durchsichtige Präparate notwendig. Bei der Auflichtmikroskopie hingegen können auch lichtundurchlässige Objekte untersucht werden. Das Licht wird dabei durch das Objektiv auf das Präparat geleitet, dort reflektiert und anschließend wieder durch das Objektiv aufgefangen, wo es zur Bildentstehung kommt (Robenek, 1995) S.35. Hinsichtlich der Bauart wird in aufrechte und inverse Mikroskope unterteilt. Bei Ersterem ist das Objektiv oberhalb des Präparates angebracht, welches die am häufigsten verwendete Bauweise darstellt. Befindet es sich jedoch unter dem Mikroskoptisch, handelt es sich um inverse Mikroskopie. Der vergrößerte Raum zwischen Beleuchtungseinheit und Tisch ermöglicht auf diese Weise das Mikroskopieren von Präparaten größerer Dichte und durch Laborgefäße hindurch. (Lichtscheidl, Irene K.)

1.2.2 Das Prinzip der Fluoreszenz

In den letzten Jahren fand ein beachtliches Wachstum im Gebrauch der Fluoreszenz in den Biowissenschaften statt. Während sie früher noch hauptsächlich Forschungswerkzeug der Biochemie und Biophysik war, so wird sie heute u.a. in der Umweltüberwachung, der klinischen Chemie, zur DNA-Sequenzierung und zur genetischen Analyse mittels Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) genutzt. Sie findet

Verwendung zur Zellidentifikation und -sortierung in der Durchflusszytometrie. Weiterhin kann mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie die Bewegung und Lage von intrazellulären Substanzen untersucht werden. (Lakowicz, 1999) S.1ff, S 15ff

Absorbiert ein Molekül Licht einer bestimmten Wellenlänge so geht es kurzzeitig in einen angeregten Zustand über. Es kann jedoch nicht in diesem Zustand verweilen und gelangt augenblicklich auf sein ursprüngliches Energieniveau zurück. Dabei wird die aufgenommene Energie u.a. durch die Emission von Licht wieder abgegeben. Diesen Vorgang nennt man Lumineszenz. Die Energie kann strahlend und strahlungsfrei abgegeben werden. Das abgestrahlte Licht ist jedoch immer energieärmer als das Anregungslicht und somit langwelliger. Daraus ergibt sich in den meisten Fällen eine Rotverschiebung um etwa 20-50 nm. Dieser Wellenlängenunterschied zwischen dem Anregungs- und Emissionslicht wird als Stokes-Differenz bezeichnet. Diese beruht auf der Stokes-Regel, welche besagt, dass die Wellenlänge des emittierten Photons in der Regel nie kleiner als die des absorbierten Photons sein kann. In Abhängigkeit von der Art des angeregten Zustandes wird die Lumineszenz formell in zwei Kategorien unterteilt: die Fluoreszenz und Phosphoreszenz. Bei der Fluoreszenz ist das sich im angeregten Singulettzustand befindende Elektron mit dem zweiten Elektron im Grundzustand gepaart, d.h. es besitzt einen entgegengesetzten Spin. Der Übergang zum Grundzustand ist spinerlaubt und erfolgt rasch unter Emission eines Photons. Die durchschnittliche Lebensdauer, also die Verweilzeit des Fluorophors im angeregten Zustand, beträgt dabei in etwa 10 ns. Als Phosphoreszenz bezeichnet man hingegen die Emission von Licht aus angeregten Triplettzuständen. Die Übergänge sind auf Grund der gleichen Orientierung des Spins verboten und erfolgen wesentlich langsamer. Die Lebensdauer kann zwischen einigen Millisekunden und mehreren Minuten liegen. Moleküle die zur Fluoreszenz fähig sind, nennt man auch Fluorophore. Sie besitzen meist eine Anordnung konjugierter Doppelbindungen in aromatischen Ringsystemen. (Stephan Frings), (Robenek, 1995) S. 68f. Man unterscheidet in intrinsische (natürlich vorkommende) und extrinsische Fluorophore, welche nur durch äußere Anregung fluoreszieren. Heute existiert eine große Auswahl an extrinsischen Fluoreszenzfarbstoffen, welche meist urheberrechtlich geschützt sind. In dieser Arbeit wurde vor allem mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYBR®Green I gearbeitet, welcher sich unspezifisch in doppelsträngige DNA-Abschnitte einlagert. Sein Absorptionsmaximum liegt bei 497 nm und das Emissionsmaximum bei 520 nm. (Molecular Probes Inc.)

1.2.3 Aufbau und Funktionsweise des Epifluoreszenzmikroskops

Die meisten Fluoreszenzmikroskope arbeiten nach dem Auflichtprinzip. Eine Quecksilberdampflampe, welche ein breites Spektrum von 360 nm bis 700 nm liefert, dient als Lichtquelle. Zuerst trifft der Lichtstrahl auf einen Eingangsbandfilter, welcher nur die gewünschte Anregungswellenlänge für den verwendeten Fluorophor passieren lässt. Als nächstes trifft dieser Strahl auf einen dichroitischen Teilerspiegel, welcher diesen Anregungsstrahl Richtung Objektträger reflektiert. Das als Kondensor wirkende Objektiv konzentriert das Licht auf das Präparat, sodass die Fluorophore angeregt werden. Diese emittieren darauf längerwelliges Licht, welches durch den dichroitischen Spiegel auf den Ausgangsperrfilter gelangt. Dieser Ausgangsperrfilter lässt Licht der gewünschten Emissionswellenlänge passieren und eliminiert noch vorhandene Anteile des Anregungslichtes. Im Idealfall nimmt nur noch das Fluoreszenzlicht an der Bildentstehung teil. Das entstandene Bild erscheint darauf im Sehfeld des Okulars, kann wahlweise aber auch mit der Digitalkamera aufgezeichnet werden. Für eine gute Abbildung ist es notwendig, dass Anregungs- und Fluoreszenzlicht vollständig voneinander getrennt werden. Für jeden gebräuchlichen Fluoreszenzfarbstoff sind Einsätze mit geeigneten Kombinationen von Filtern und dichroitischen Spiegeln erwerbbar. Fluoreszenzfiltersätze gibt es in unterschiedlichen Spezifikationen. (Mikroskop Begleitheft), (Robenek, 1995) S. 69f.

Ein nicht zu vernachlässigender Effekt, der sich beim Umgang mit Fluoreszenzfarbstoffen meist als hinderlich erweist, ist die Photobleichung. Sie bezeichnet die Tatsache, dass Fluorophore nach langer Bestrahlung mit dem Anregungslicht die Fähigkeit zur Fluoreszenz verlieren. Die Fluorophor-Moleküle werden dabei photochemisch zerstört. Die Stärke dieses Effektes hängt von der Bestrahlungsdauer und -intensität ab und ist je nach Fluorophor, und der Umgebung in der er sich befindet, verschieden. Im Allgemeinen ist dieses Phänomen und dessen exakter Mechanismus bisher schlecht verstanden und wenig erforscht. (Song et al. 1995)

1.3 Trennverfahren zur Zellgewinnung

Die Reinigung und Isolation eines biotechnologisch erzeugten Produktes hängt von der gewünschten zu erzielenden Produktionsmenge bzw. Produktkonzentration, dem angestrebten Reinheitsgrad und der Zusammensetzung des Nährmediums ab. Die verschiedenen Verfahren werden entsprechend der Eigenschaft des Produktes, welche sie sich zur Trennung zunutze machen, eingeteilt. Die Verfahren sind durch ihren Trennbereich begrenzt und demzufolge nicht für jede Art der Produktgewinnung anwendbar. Handelt es sich um die Separation unter Ausnutzung von Dichteunterschieden spricht man von Sedimentation oder Zentrifugation. Bei einer Trennung der Größe nach spricht man von Filtrations- oder Gelchromatographieverfahren. Die Flotation berücksichtigt Oberflächenkräfte, während sich die Extraktion die Löslichkeitseigenschaften einer Substanz zunutze macht. Eine Aufteilung nach Dampfdruckunterschieden kommt bei der Destillation und Gefriertrocknung zum Einsatz. Aufspaltungen der Ladung nach werden bei der Elektrodialyse und unter Verwendung eines Ionenaustauschers realisiert und Diffusionseigenschaften spielen bei der Osmose und Dialyse eine Rolle.

Die Zentrifugation ist eine Methode zur Trennung von Stoffgemischen im Fliehkraftfeld unter Ausnutzung von Dichteunterschieden. Sie ist abhängig von einer Reihe an Faktoren. So spielt die Zentrifugationszeit, die Temperatur, Partikelgröße und -form, die Viskosität und der Anteil an Feststoffen in der Flüssigkeit eine entscheidende Rolle bei der Zellabtrennung. All diese Aspekte gilt es zu berücksichtigen und zu optimieren. Zentrifugen werden nach ihrem Funktionsprinzip eingeteilt. So unterscheidet man zwischen Sedimentationszentrifugen mit Vollmanteltrommel und Filtrationszentrifugen mit perforierter- oder Siebtrommel. Diskontinuierliche Betriebsweisen mit einmaliger Suspensionszugabe werden mit Laborzentrifugen bzw. Kammerseparatoren realisiert, während Dekanter oder Düsenseparator einen kontinuierlichen Suspensionszulauf und Klarphasenablauf ermöglichen. Zentrifugen sind entweder mit Festwinkel- oder Ausschwingrotoren ausgestattet, welche das Absetzverhalten der abzuscheidenden Partikel auf unterschiedliche Weise beeinflussen. (Knippers, 2006) S.28f

Die Filtration hingegen ist ein Verfahren zur Trennung von Stoffgemischen unterschiedlichen Aggregatzustandes mit Hilfe poröser Filterschichten unter Ausnutzung von Größenunterschieden. Filtrationsverfahren werden u.a. nach Partikel- bzw. Molekülgröße der abzutrennenden Substanzen unterschieden (Abb. 1). Beim Einsatz von Filtermembranen im Bereich von 0,1-10 µm Porendurchmesser und Partikeln mit einem

Molekulargewicht größer als 1 Kilodalton spricht man von Mikrofiltration. Triebkraft ist hier die hydrostatische Druckdifferenz, welche in der Regel 0,1-5 bar beträgt. Im Allgemeinen kann man davon ausgehen, dass die Größenverteilung der Filterporen nicht gleichmäßig ist, sondern die Porengröße eher empirisch ermittelt wird (Abb. 2). Bei einem idealen Filter findet keine Adsorption an der Membran statt, und es werden keine Extrakte aus der Membran gelöst. Geringe Totvolumina sind zusätzlich von Vorteil. Filtrationsverfahren werden in statische (Dead-End-Filtration) und dynamische (Cross Flow-Filtration) unterschieden. Bei der Dead-End-Filtration wird die Suspension senkrecht angeströmt. Man unterscheidet hier in zwei Varianten. Kommt es zu einer Kuchenbildung auf der Filterschicht spricht man von einer Kuchenfiltration. Der Widerstand, welcher durch den Kuchen verursacht wird ist bei dieser Methode meist viel größer als der Membranenwiderstand. Die Filtergeschwindigkeit wird herabgesetzt und es besteht die Gefahr, dass sich der Filter zusetzt. Bei der Tiefenfiltration wird dieses Problem unter Verwendung von Filterhilfsmitteln, dem sogenannten Precoat, umgangen. Die Bildung einer echten Kuchenschicht wird verhindert und es kann ein konstanter Filtratstrom erreicht werden. Dieses Verfahren ist jedoch nur für Feststoffvolumenkonzentrationen < 0,5 % einsetzbar und eine Feststoffrückgewinnung ist nur erschwert bzw. nicht möglich. Weshalb sich dieses Verfahren nicht für die hier angestrebte Zellabtrennung eignet. Ein kontinuierliches Verfahren stellt hingegen die Cross-Flow-Filtration dar. Die Suspension wird dabei tangential angeströmt. Der Feststoff scheidet sich an der Oberfläche ab und dringt nicht in die Filtermatrix ein. Es kommt zur Bildung einer Deckschicht, es entsteht jedoch kein echter Kuchen. Somit sind konstante Filtrationsgeschwindigkeiten über lange Zeiträume realisierbar. Das Retentat wird rückgeführt und strömt mehrfach an der Membran vorbei. Die Cross-Flow-Filtration ermöglicht deshalb jedoch nur eine Aufkonzentrierung der Zellen. (Uni-Hannover), (Kunz, 1992) S.81f

Bei dem Verfahren der Vakuumdestillation wird der Druck vermindert, um den Siedepunkt der zu verdampfenden Komponenten herabzusetzen. Dieser ist dabei definiert als diejenige Temperatur bei der der Dampfdruck einer Flüssigkeit gleich dem Normdruck entspricht. Das Verfahren ist nützlich, um thermisch instabile oder anfällige Substanzen oder Lebewesen bei der Stoffabtrennung zu schonen. Dazu wird eine Vakuumpumpe an die Destillationsapparatur angeschlossen. (Kluczka, Sven)

Die genannten Trennverfahren werden in der hier vorliegenden Arbeit hinsichtlich ihrer Effektivität, Realisierbarkeit, Reproduzierbarkeit und Zuverlässigkeit eingehend untersucht. Um schließlich das Verfahren herauszufiltern, welches für die Aufkonzentrierung der CBDB1-Zellen aus einer Flüssigkultur am besten geeignet ist.

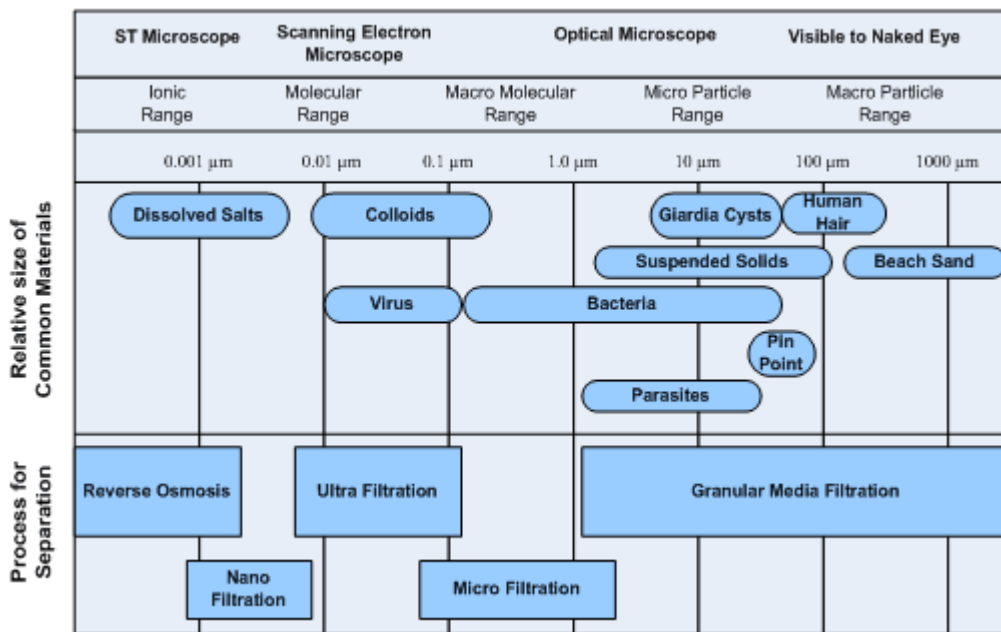


Abb. 1: Übersicht verschiedener Filtrationsverfahren (ACTEW Corporation Ltd)

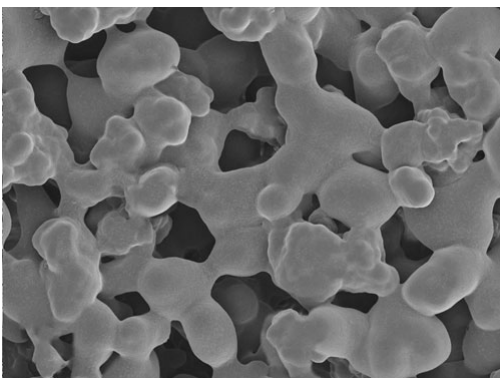


Abb. 2: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Polyethylenfiltermembran (Köpp, Oliver)

1.4 Ziel der Arbeit

Um den Erfolg einer Kultivierung und die entsprechende Wachstumsrate der Bakterien in Reinkulturen abzuschätzen, muss ein geeignetes Verfahren gefunden werden, um die Zellen quantifizieren zu können. Eine Trübungsmessung wie sie für *Escherichia coli* angewandt wird ist für CBDB1 leider nicht möglich, da dieses Bakterium in den niedrigen Konzentrationen, in denen es vorliegt keine messbare Trübung hervorruft und andere in der Lösung vorhandene Komponenten wiederum die Absorption und Streuung von Licht beeinflussen. So gibt es Kulturen, welche trotz derselben Zellkonzentration unterschiedliche Trübungen aufgrund von gebildeten Niederschlägen aufweisen. Auf

Grund der Abmaße von in etwa nur $0,2\ \mu\text{m} \times 0,5\ \mu\text{m}$ der Zellen, sind diese mit Hilfe der einfachen Lichtmikroskopie nur sehr schwer detektierbar, wenn sie in einer Lösung schwimmen. Deshalb müssen sie so fixiert werden, dass die größere Seite von $0,5\ \mu\text{m}$ flach aufliegt. Hierfür wurde ein mikroskopisches Verfahren etabliert, welches sich dem Prinzip der Fluoreszenz bedient (Adrian et al. 2007). Diese fluoreszenzmikroskopische Methode sollte im Rahmen dieser Arbeit so modifiziert werden, dass eine verlässliche und reproduzierbare Bestimmung der Bakterienzahl in Reinkulturen möglich ist und die Präzision der Methode abgeschätzt werden kann. Mit diesem Verfahren werden verschiedene Zellaufkonzentrierungsverfahren miteinander verglichen, um dasjenige aufzufinden, welches eine effektive Isolierung der Bakterien aus Reinkulturen erlaubt, damit diese für weitere physiologische Untersuchungen wie z.B. proteomische Analysen zur Verfügung stehen.

Wie bereits erwähnt ist noch wenig über die genaue Vielfalt, Verteilung und Funktion der verschiedenen *Dehalococcoides* spp. bekannt. Deshalb sollten weitere Detektionsuntersuchungen durchgeführt werden, damit eine größere Datenmenge über das Vorkommen dieser Bakterien zur Verfügung steht. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Entwicklung einer quantitativen Real Time PCR (qPCR)-Methode. Diese dient ebenfalls zur Quantifizierung von anaeroben Bakterien in Reinkulturen. Gegenüber der Zählung mit dem Mikroskop hat sie jedoch den Vorteil, dass sie auch eine Zellzahlbestimmung in Mischkulturen und anderen Medien ermöglicht. Mit dieser zu etablierenden Methode soll der prozentuale Anteil an den *Dehalococcoides*, welche den *Chloroflexi* angehören (DRC), zur Gesamtbakterienzahl in Sedimentproben abgeschätzt werden. Die qPCR stellt dabei eine Weiterentwicklung der konventionellen PCR dar, allerdings mit dem entscheidenden Vorteil, dass amplifizierte DNA-Fragmente noch während der Reaktion detektiert werden können. Zur Bestimmung der DRC wird ein Primerpaar verwendet, welches auf die 16S rRNA Gene dieser Bakteriengattung abzielt. Da diese Bakterien nur eine Kopie des 16S rRNA Gens in ihrer DNA enthalten (Kube et al. 2005), kann von der Anzahl der detektierten Kopien der 16S rRNA Gene auf die ursprüngliche Menge an Ausgangs DNA in den Extrakten und somit auf den Gehalt an den DRC in den jeweiligen Sedimenten geschlossen werden. Zum Schluss sollen die beiden behandelten Quantifizierungsverfahren hinsichtlich ihrer Anwendbarkeit miteinander verglichen werden.

1.5 Molekularbiologische Vorarbeiten

1.5.1 Herkunft der bakteriellen Mischkulturen und Sedimentproben

Die in dieser Arbeit untersuchten marinen Sedimente stammen von verschiedenen Expeditionen. Die Proben des Plattenrandes von Peru ($8^{\circ}59.5'S$, $79^{\circ}57.40'W$) wurden während des Ocean Drilling Programms (ODP) Leg 201 im März 2002 gesammelt. Peru 1 stammt aus 0,25 m und Peru 6 hingegen aus 7,96 m Sedimenttiefe. Die Sedimente der Küste von Sumatra ($1^{\circ}45.57'N$, $96^{\circ}46.44'E$), Indonesien wurden im September 2006 während der Seereise SO189-2 gehoben. Die Proben 1-5 stammen jeweils aus 0.2-0.3 m, 1.52-1.62m, 3.02-3.12 m; 4.52-4.62 m; 6.02-6.12 m. Und die Sedimente 1-3 des schwarzen Meeres ($44^{\circ}24.106'N$, $32^{\circ}51.268'E$) stammen von der Seereise M72-5 von RV Meteor aus 15 cm, 160 cm, 360 cm Sedimenttiefe. Die Irland Sedimente stammen vom „Integrated Ocean Drilling Program“ (IODP) Expedition 307 im Jahr 2005 südwestlich von Irland. Das Sediment Irland 18 mit der genauen Bezeichnung 1318-A-3H-3 145-155 wurde aus 23 m Sedimenttiefe entnommen, Irland 17 mit der Beschreibung 1317D-14R-3 137-145, hingegen aus 227 m Sedimenttiefe. Das Aarhus Sediment M1 GC A/2 stammt aus 4,4 m Sedimenttiefe aus der Bucht von Aarhus und wurde 2008 gehoben. Die Sedimente aus dem Wattenmeer der Nordsee nahe Husum ($54^{\circ}06.612'N$ $008^{\circ}56.067'E$) wurden am 8. Oktober 2010 durch Ken Wasmund und Christina Lachmann genommen. Die Proben 7 bis 9 stammen dabei von einem 1.5 m, die Probe Nordsee 13 von 1 m und die Probe 15 aus einem 2.5 m langen Bohrkern. Die Probe 18 hingegen nur aus 15 cm Tiefe. Die Proben mit der Bezeichnung Neapel wurden 2009 im Hafengebiet dieser Stadt genommen. Die Sedimentproben Chile oben und Chile unten stammen aus dem selben Bohrkern 7155-4 jeweils aus den Tiefen 437-442 cm und 635-640 cm unter dem Meer ($34^{\circ}35.00'S$ $72^{\circ}53.11'W$). Die Proben wurden am 21. April 2001 gehoben. Alle Sedimente wurden bis zur DNA Extraktion anaerob und bei $4^{\circ}C$ gekühlt gelagert.

1.5.2 Herstellung der Standards für die qPCR

Die in dieser Arbeit eingesetzten Standards zur Quantifizierung der DNA-Kopienzahl der universellen Bakterien und DRC wurden von Kenneth Wasmund entwickelt und nach folgender Methode hergestellt:

Es handelte sich dabei um eine Verdünnungsreihe eines aufgereinigten PCR Produktes, welches von einem geklonten den *Dehalococcoides* angehörigen Chloroflexi 16S rRNA Gen (Klon Chile-28, Genbank Zugangsnummer 123456789) erhalten wurde. Dieses Gen wurde in einer Klonbibliothek, welche zuvor von den Sedimenten der chilenischen Küste erstellt wurde, aufgefunden. Die Gensequenz des Klons wurde durch direkte Kolonie-PCR mit auf den M13 Vektor abzielenden spezifischen Primern vervielfältigt. Das erhaltene PCR Produkt wurde daraufhin durch eine Standard-Gelelektrophorese überprüft und mit einem PCR clean up System (Promega) nach Anweisungen des Herstellers aufgereinigt. Mit dem NanoDrop ND 1000 (NanoDrop Technologies) Spektrophotometer wurde daraufhin die DNA Konzentration bestimmt. Diese wurde anschließend in Kopien pro μl umgerechnet und die Konzentration des Standards auf 1×10^{11} Kopien pro μl eingestellt. Von diesem wurde dann eine 10er Verdünnungsreihe angefertigt, aliquotiert und bei -80°C gelagert.

1.5.3 Design und Tests der Primer zur Bestimmung der DRC

Das Design und die Tests der Primer erfolgte ebenfalls durch Kenneth Wasmund. Im Folgenden ist sein Vorgehen zum Erlangen dieser Primer kurz zusammengefasst:

Mit Hilfe der Sondendesign Funktion des ARB Software Paketes und der Nutzung der ARB Datenbank (Ludwig et al. 2004) wurden Primer kreiert, welche jedoch in Bezug auf die Amplifikation der 16S rRNA Gene der den DRC noch fehlerbehaftet waren. Bei anfänglichen Tests durch Klonen und Sequenzieren von PCRProdukten wurden Fremdsequenzen identifiziert, welche nicht von ARB vorhergesagt wurden waren. Um die Spezifität des Testansatzes zu erhöhen, wurden alle Sequenzen der den DRC von der ARB Datenbank exportiert und mit einer Sammlung von Fremdsequenzen, welche mit der ersten Primerversion amplifiziert wurden mit Hilfe des Computerprogramms MUSCLE (Edgar 2004) abgeglichen. Es wurden dabei hauptsächlich die Basen am 3'-Ende der Primer verändert, um die Möglichkeit der Amplifikation von Fremdsequenzen

auszuschließen. Dadurch wurde ein Primerpaar erhalten, welches zu über 92 % den 600 verfügbaren Sequenzen von der ARB Datenbank entspricht. In Anbetracht, dass sogar 3'-Fehlverknüpfungen zu Fremdsequenzen die spezifische Amplifikation in weiteren Tests bei niedrigen Anlagerungstemperaturen nicht ermöglichten, wurde die Spezifität durch genaues Testen von Anlagerungstemperaturen erhöht. Dies geschah unter Verwendung von Klonen, welche DRC- und Fremdsequenzen enthielten. Danach wurde als optimales Anlagerungstemperaturprogramm eine *Touchdown* PCR von 65°C auf 63°C für die DRC-Primer bestimmt.

2 Material und Methoden

2.1 verwendete Materialien

2.1.1 Chemikalien

Das zweifach destillierte Wasser (ddH₂O) wurde einer Ultra Clear Anlage der Firma SG Wasseraufbereitung und Regenerierstation GmbH (Barsbüttel) entnommen. Die verwendeten Chemikalien wurden jeweils in der pro analysis (p.a.) Qualität verwendet und wenn nicht anders vermerkt von den Firmen AppliChem (Darmstadt), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Deisenhofen) und Fluka (Buchs, Schweiz) bezogen. Die Synthese der verschiedenen eingesetzten Primer wurde von Tib MolBiol (Berlin) durchgeführt.

2.1.2 verwendete Lösungen

Bicarbonatlösung:

Es wurden 7,06 g NaHCO₃ unter anoxischer CO₂ gesättigter Atmosphäre in 84 ml anaeroben H₂O gelöst, verschlossen und autoklaviert.

Spurenelementlösung SL 9 (abgeändert nach Tschech und Pfennig 1984):

Stammlösung:

Tab. 1: Zusammensetzung der Spurenelementlösung

Komponente	Konzentration
NTA	12,8 g/l
FeCl ₂ x 4 H ₂ O	2 g/l
ZnCl ₂	70 mg/l
MnCl ₂ x 2 H ₂ O	80 mg/l
H ₃ BO ₃	6 mg/l
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	190 mg/l
CuCl ₂ x 2 H ₂ O	2 mg/l
NiCl ₂ x 6 H ₂ O	24 mg/l
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	36 mg/l
H ₂ O	ad 1000 ml

Die Lösung wurde mit NaOH auf pH-Wert 6 eingestellt, durch Autoklavieren sterilisiert und anschließend bei 4°C gelagert.

Minerallösung: (Süßwassermedium, Widdel 1980):

Stammlösung (50x):

Tab. 2: Zusammensetzung der Widdellösung

Komponente	Konzentration
KH_2PO_4	10 g/l
NH_4Cl	13,5 g/l
NaCl	50 g/l
$\text{MgCl} \times 6 \text{ H}_2\text{O}$	20,5 g/l
KCl	26 g/l
$\text{CaCl}_2 \times \text{H}_2\text{O}$	7,5 g/l
H_2O	ad 1000 ml

Die Lösung wurde durch autoklavieren sterilisiert und anschließend bei 4°C gelagert.

Titancitrat-Lösung:

Die Titancitrat-Lösung wurde in einer 250-ml-Dreihalsflasche hergestellt. Durch einen der GL-14 Anschlüsse wurde diese permanent mit Stickstoff begast. Eine zweite Öffnung diente der pH-Wert Messung und durch die dritte wurden die Komponenten hinzu pipettiert. Ein Magnetrührer dient zur kontinuierlichen Durchmischung. Zuerst wurden 120 ml reines anoxisches ddH₂O, 20.6 ml 15 %-iges Titan(III)-chlorid und 40 ml frisch angesetzte 1 M Natriumcitratlösung in die Flasche überführt. Mittels der Zugabe von festem Natriumcarbonat (Na₂CO₃) und wenn nötig konzentrierter Salzsäure wurde der pH-Wert auf 7 eingestellt. Die Lösung wurde anschließend steril in eine autoklavierte, anaerobe Braunglasflasche filtriert. Die Flasche wurde anschließend dunkel und kühl gelagert.

Vitamin-7-Lösung (abgeändert nach Widdel 1980):

Stammlösung (1000x):

Tab. 3: Zusammensetzung der Vitamin-7-Lösung

Komponente	Konzentration
4-Aminobenzoessäure	20 mg/l
D (+)-Biotin	5 mg/l
Nicotinsäure	50 mg/l
Ca-D (+) Pantothenat	25 mg/l
Pyridoxinhydrochlorid	75 mg/l
Thiaminchlorid-di-hydrochlorid	50 mg/l
Cyanocobalamin	25 mg/l

Die Lösung wurde anschließend steril in Braunglasflaschen mit anaerober Atmosphäre filtriert.

TE-Puffer:

Tab. 4: Zusammensetzung des TE-Puffers

Komponente	Konzentration
Tris-HCl	10 mg/l
EDTA	10 mg/l

2.1.3 Herstellung des Standard-Zeltmedium für CBDB1-Kulturen

Für ein Volumen von 1 l Medium wurden zuerst 800 ml ddH₂O in eine Schottflasche gefüllt. Der Reihe nach wurden nun 20 ml Widdellösung, 10 ml SL-9-Lösung, 5 ml 1 M Natrium-Acetat-Lösung und 50 µl steril filtriertes Resazurin hinzu gegeben und die Lösung auf 1 l mit ddH₂O aufgefüllt. Das Medium wurde daraufhin etwa eine Stunde entgast. Dazu wurde die Schottflasche mit leicht geöffnetem Deckel in die Schleuse eines Anaerobzells gestellt und solange Vakuum angelegt, bis sich im Medium Blasen bilden. Dies ist bei etwa 40 mbar erreicht. Das Medium wurde anschließend mit Stickstoff für 30 min sprudelnd begast. Nun wurde es ins Anaerobzelt mit Stickstoffatmosphäre und ca. 3 % Wasserstoff geschleust und zum Equilibrieren, 1 h offen stehen gelassen. Es konnten nach Bedarf in kleinere Volumina aliquotiert werden. War dies geschehen, wurden die einzelnen Flaschen ebenfalls nochmals eine Stunde offen stehen gelassen bevor sie mit Teflon beschichteten Septen zugedrimpt wurden. Alle Flaschen wurden anschließend autoklaviert. Als das Medium auf mindestens 20°C abgekühlt war, wurden pro Liter Medium 10 ml 1M NaHCO₃-Lösung, 7,5 ml Ti(III)Citrat-Lösung mittels einer Spritze anoxisch und steril zugegeben. Nachdem das Medium abermals 24 h equilibriert wurden, konnten 10 ml der Vitaminlösung 100x hinzu gegeben werden. Es erfolgte zuletzt die Zugabe des TCB-Gemisches, welches aus den Isomeren 1,2,3- und 1,2,4-Trichlorbenzol im Masseverhältnis 1:1 hergestellt wurde und als Elektronenakzeptor dient. Das kristalline 1,2,3-Trichlorbenzol löste sich in dem flüssigen 1,2,4-Trichlorbenzol. Die Zugabe erfolgte in dem Maße, dass eine Endkonzentration von 80 µM gegeben war. Zum Schluss wurden die Kulturflaschen mit einem Überdruck von 0,2 bar Biogon-Gas (80 % Stickstoff, 20 % Kohlenstoffdioxid) bzw. 0,3 bar Wasserstoff, welches den Elektronendonator darstellte, durch Einführung einer Begasungsnadel für jeweils etwa 10 Sekunden begast. Das Gas wurde zuvor über eine Reduziersäule der Firma Ochs

(Göttingen) geleitet, um es von Sauerstoffkontaminationen zu befreien. Die Flaschen wurden nun mit 1-5 % Inokulum beimpft. Bei der Herstellung von HCB Kulturen, wurde eine Spatelspitze vor dem Aliquotieren, in die einzelnen Flaschen gegeben. Das Anaerobzelt wurde mit Formiergas (95 % Stickstoff, 5 % Wasserstoff) und Stickstoff betrieben. Sensoren zur Überwachung des Sauerstoff- und Wasserstoffgehaltes (COY Laboratory Products Inc.) sowie der Luftfeuchtigkeit und Temperatur (Extech Instruments) waren vorhanden, um die anaeroben Konditionen zu überwachen. Wenn es zum Eintrag von Sauerstoff kam, wurde dieser über zwei Platinkatalysatoren zu Wasser reduziert. Kieselgel kam zum Einsatz, um die Luftfeuchtigkeit auf ca. 30-50 % konstant zu halten.

2.2 Mikroskopische Zellzählungen

2.2.1 Herstellung von mit Agarose beschichteten Objektträger

Zur mikroskopischen Untersuchung wurden die Bakterien auf Agarose beschichteten Objektträgern immobilisiert, um sie in einer Ebene zu fixieren und zu gewährleisten, dass die diskusförmigen *Dehalococcoides* Zellen durch das Aufquellen der Agarose nach Zugabe der Bakteriensuspension platt gedrückt wurden und deshalb besser detektierbar waren. Zur Aufbringung der Agarose auf die Objektträger wurden diese zuvor im Wasserbad auf etwa 80°C erhitzt, um ein abruptes Abkühlen der heißen Agaroseschicht und daraus folgende Verzerrungen dieser Schicht, zu unterbinden. Es wurden 2 ml einer 1,67 %-igen heißen Biozym LE Agaroselösung (Oldendorf, Deutschland) gleichmäßig auf den Objektträgern verteilt und diese anschließend staubfrei unter einer Sterilbank getrocknet. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Lüftung der Bank deaktiviert war, damit ein langsames Trocknen der Agaroseschicht ermöglicht und Verzerrungen weitestgehend unterbunden wurden. Bis zur vollständigen Trocknung der Agaroseschicht vergingen in etwa 48 Stunden.

2.2.2 Zellzahlbestimmung mittels Fluoreszenzmikroskopie

Mikroskop (OPTIPHOT-2; Nikon) (Abb. 3):

Lampe: HBO 103W/2 (OSRAM GmbH, Augsburg)

Netzteil (Lampe): HB-10101AF

Filtereinsätze: DM510 B2A

Objektiv: 40x (0,65) 160/0.17 WD 0.6

Okular: CFWN 10x/20

Digitalkamera: DXM 1200F

alle Produkte stammen von Nikon aus Düsseldorf

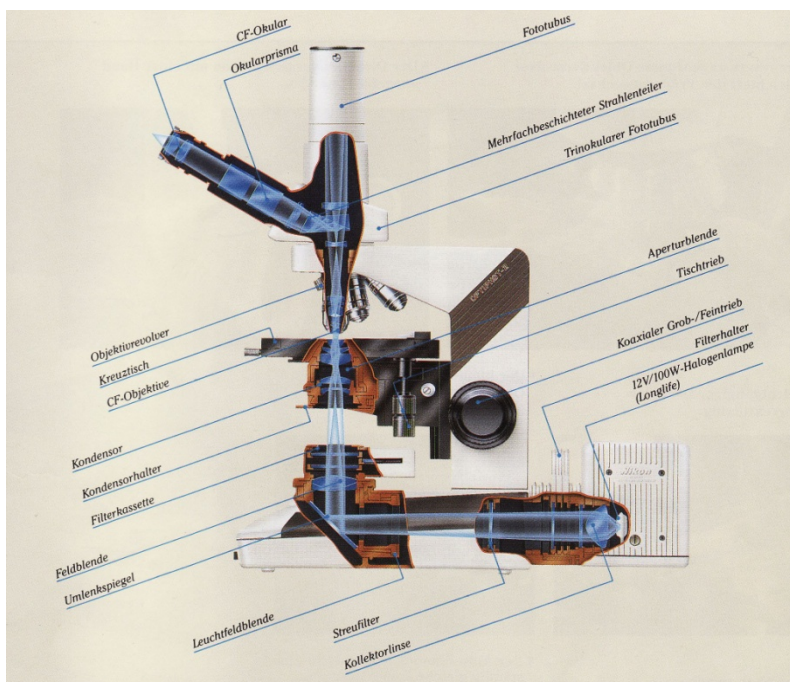


Abb. 3: Aufbau des Optiphot-2 der Firma Nikon (Mikroskop Begleitheft)

Eine 1:100 SYBR[®] Green I (Invitrogen[™] Molecular Probes[®], Eugene USA) Gebrauchslösung wurde mit einem steril gefilterten TE-Puffer (pH-Wert 7,2) hergestellt. Die zu untersuchende Kultur wurde vor der Probenentnahme kräftig geschüttelt, um eine homogene Verteilung der Zellen zu gewährleisten. 20 µl einer Bakteriensuspension und 1 µl der SYBR Green - Gebrauchslösung wurden in einem Eppendorfgefäß gemischt und für 10 min im Dunkeln inkubiert. Die Zellsuspension wurde gevortext und danach ein Volumen von 18 µl auf einem Agarose beschichteten Objektträger aufgebracht und zügig mit einem 20 mm x 20 mm Deckgläschen abgedeckt. Diese Menge wurde gewählt, weil sie das Gebiet unter dem Deckgläschen optimal ausfüllt ohne am Rand herauszulaufen. Im Idealfall waren die Zellen nun gleichmäßig auf der 400 mm² Fläche verteilt. Die Zellen

wurden mit dem Epifluoreszenzmikroskop OPTIPHOT-2 und einer 625-fachen Vergrößerung mittels Blaulicht Anregung und einem DM510 B2A Filter betrachtet. Aus statistischer Sicht ist der Wert für den Zellgehalt einer untersuchten Probe umso verlässlicher, desto mehr Bilder aufgenommen wurden, dies geht jedoch auf Kosten der Versuchszeit. Aus praktischen Gründen wurden deshalb für jede zu untersuchende Kultur drei Proben genommen und pro Probe jeweils zehn mikroskopische Aufnahmen verschiedener zufälliger Ausschnitte mit der Digitalkamera DXM 1200F aufgezeichnet. Bei den verwendeten Geräten handelte es sich um Nikonprodukte (Düsseldorf). Eine Mikrometerskala, welche mit demselben Fokus abfotografiert wurde, diente zur Kalibrierung. Mithilfe der ImageJ Software wurden die Abmaße des erfassten Bildausschnittes bestimmt. Dieser Bildausschnitt wurde im Rahmen dieser Arbeit durch das Einbauen eines Adapters (Nikon, Düsseldorf) von $129\text{ }\mu\text{m} \times 103\text{ }\mu\text{m}$ auf $172,97\text{ }\mu\text{m} \times 138,38\text{ }\mu\text{m}$ vergrößert. Die Software verarbeitete die Bilder in dem Maße, dass mittels eines weiteren Plug-In die Zellen, welche als grüne Punkte verschiedenster Größe und Farbintensität dargestellt sind, quantifiziert werden konnten. Die genaue Verarbeitung ist in (Adrian et al. 2007) beschrieben. Parameter wie die minimale und maximale Partikelgröße der Farbpunkte bzw. der Schwellenwert für deren Leuchtdichte, wurden festgelegt, um unspezifische Signale zu eliminieren. Für die Zählung der CBDB1-Zellen wurden jeweils die Werte 30 Pixel, 400 Pixel und 65 cd/m^2 in die Software eingegeben. Auf der Grundlage, dass die gesamte Zellsuspension gleichmäßig über den Bildausschnitt verteilt war, konnte darauf folgend der Mittelwert und die Standardabweichung der Zellen pro mikroskopischer Aufnahme rechnerisch ermittelt werden. Die Konzentration der Zellen pro $18\text{ }\mu\text{l}$ wurde anschließend jeweils auf 1 ml extrapoliert. Die Detektionsgrenze des Verfahrens liegt bei etwa $9,3 \times 10^5$ Zellen pro ml, welches in etwa einer Zellen pro mikroskopisch aufgenommenen Bild entspricht. Die Methode wurde aufgebaut nach Orientierung an (Adrian et al. 2007).

2.3 angewandte Trennverfahren

2.3.1 Zentrifugation

Für die Zentrifugation wurde ebenfalls eine dem gewünschten Versuch entsprechende Menge Bakteriensuspension steril und anaerob aus einer Kulturflasche entnommen und in ein Falcongefäß überführt. Dieses wurde anschließend in einer Centrifuge 5804 R für 60 min bei einer g-Zahl von 3600 bzw. Mengen unter zwei Milliliter in einer Centrifuge 5415 R

(beide Eppendorf, Hamburg) bei 8000 x g für 30 min zentrifugiert. Beide Zentrifugen wurden mit Festwinkelrotoren betrieben. Der Überstand wurde mit einer Pipette vorsichtig abgenommen, bevor das Pellet durch vortexen resuspendiert wurde. Anschließend wurde die Zellkonzentration mit der Methode der mikroskopischen Zählung bestimmt und daraus wurden die Zellausbeuten und Anreicherungsfaktoren berechnet. Die Zellausbeute entspricht dem Verhältnis der Gesamtzellzahl im hergestellten Konzentrat zur Gesamtzellzahl in der Ausgangskultur. Der Anreicherungsfaktor beschreibt die Erhöhung der erzielten Zellkonzentrationen in dem Konzentrat bezogen auf die Zellkonzentration in der Ausgangskultur.

2.3.2 Filtration

Zur Filtration von Bakterienkulturen wurde eine sterile Spritze mit anaeroben Wasser gespült und anschließend mit dieser Medium aus einer Kulturflasche entnommen. Danach wurde die Kanüle entfernt und die Spritze zum Filtern des Kulturmediums direkt auf den gewünschten Spritzenvorsatzfilter aufgesetzt. Das Retentat wurde entweder zur Analyse in einem Falcongefäß aufgefangen oder verworfen. Anschließend wurden die Bakterienzellen mit Hilfe eines speziellen Luer-lock female-female Adapters (Pieper Filter GmbH, Bad Zwischenahn) und reinem Medium entgegen der vorherigen Filterrichtung wieder von der Membran gewaschen und in einem Eppendorf- bzw. Falcongefäß aufgefangen. Die Zellkonzentration im Eluat konnte nun mittels mikroskopischer Zählung bestimmt werden. Für die verschiedenen Experimente kamen unterschiedliche Spritzenvorsatzfilter zum Einsatz (Tab. 5).

Tab. 5: Verwendete Spritzenvorsatzfilter

Filterbezeichnung	Hersteller	Porengröße	Durchmesser	Membranmaterial	Abkürzung
MS® PES Membrane Filter	Membrane Solutions	0,1 µm	13 mm	PES	PES 0,1
Sterile Syringe Filter	VWR™ International	0,2 µm	25 mm	PES	PES 0,2
Minisart Filter 16534	Sartorius Stedim	0,2 µm	26 mm	CA / PES	CA 0,2
Minisart Filter 16555	Sartorius Stedim	0,45 µm	26 mm	CA / PES	CA 0,45
Minisart Filter 16569	Sartorius Stedim	0,65 µm	26 mm	CA / PES	CA 0,65
Minisart Filter 16592	Sartorius Stedim	0,8 µm	26 mm	CA / PES	CA 0,8
Minisart Filter 17593	Sartorius Stedim	1,2 µm	26 mm	CA / PES	CA 1,2

CA: Celluloseacetat, PES: Polyethersulfon

2.3.3 Vakuumdestillation

Für die Vakuumdestillation wurden 30 ml einer CBDB1-Kultur anaerob in einen Glasrundkolben überführt. Dieser wurde rasch an den Vakuumverdampfer (Vacuubrand, Wertheim) (Abb. 4) angesteckt. Danach wurde ein Vakuum von 60 mbar angelegt. Der Kolben rotierte dabei in einem 37°C warmen Wasserbad. Das Bakterienmedium wurde je nach Belieben durch Verdampfen auf unterschiedliche Endmengen reduziert. Das Verdampfen von 10 ml benötigte in etwa zwanzig Minuten. Der Dampf kondensierte dabei in einer an den Kolben angeschlossenen Kühlsäule und wurde in einem separaten Glaskolben gesammelt.



Abb. 4: Aufbau des Vakuumverdampfers

2.4 Die quantitative Real Time PCR (qPCR)

2.4.1 Durchführung der qPCR

Die Durchführung der qPCR zur Bestimmung der Bakterien-DNA-Kopienzahl in Umweltproben erfolgte mit dem StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems und die Analyse der Ergebnisse mit Hilfe der STEPONE v2.1 Software (beides Applied Biosystems, Foster City USA) nach Anleitung des Herstellers. Die genaue Zusammensetzung des 20 µl Reaktionsansatzes für die qPCR ist in Tab. 6 zusammengestellt. Der Passivfarbstoff ROX diente als interne Kontrolle für kleine Unterschiede im *Mastermix*-Volumen sowie nicht PCR bezogener Schwankungen im Fluoreszenzsignal (Wong et al. 2005). Es wurden zwei verschiedene Versuchsansätze etabliert. Zum einen wurde die Gesamtbakterien-

DNA-Kopienzahl in den Sedimentextrakten mit Hilfe der universellen Bakterienbreitbandprimer 341f and 534r (Muyzer et al. 1996) bestimmt. Die Primer Dehal Fa and Dehal R wurden hingegen für die Quantifizierung der den *Dehalococcoides* angehörigen *Chloroflexi* (DCR) verwendet. Aus den ermittelten Kopienzahlen der beiden Methoden konnte schließlich die relative Menge an DRC-DNA im Verhältnis zur Gesamtbakterien-DNA in den Sedimenten abgeschätzt werden. Die genauen Primersequenzen, Schmelztemperaturen und eingesetzten Konzentrationen pro Reaktionsansatz sind der Tab. 7 zu entnehmen. Um akzeptable qPCR-Effizienzen zu erzielen, wurden alle Primer bis zum Gebrauch in Einzelaliquoten bei -80°C gelagert.

Tab. 6: Zusammensetzung des 20 μl Reaktionsansatzes für die qPCR

Komponente	Volumen
PCR - H_2O	7 μl
2 x SensiMix	10 μl
forward- Primer	1 μl
reverse- Primer	1 μl
Template- DNA	1 μl

Der 2xSensiMix™SYBR-Mastermix enthielt folgende Komponenten aus dem SensiMix™ SYBR Kit (Bioline, Deutschland):

- hitzeaktivierbare DNA-Polymerase
- hoch aufgereinigte dNTP's
- 6 mM MgCl_2
- ROX
- SYBR® Green I

Tab. 7: Übersicht über die verwendeten Primerpaare für die qPCR

Primerpaar	Bezeichnung	Primersequenz	T_s	Konzentration
DRC-Primer	Dehal Fa	5'-TACGGGAGGCAGCAGCDA-3' (18)	59°C	5 μM
	Dehal R	5'-ARRAGGGTCGATACYCC-3' (17)	54°C	5 μM
Bakterienprimer	341 f	5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3' (17)	60°C	1 μM
	534 r	5'-ATTACCGCGGCTGCTGGCA-3' (19)	61°C	1 μM

T_s : Schmelztemperatur der Primer

Bei den Primern zur Bestimmung der DRC handelt es sich um degenerierte Primer mit gewobbelten Basenbereichen. Das D kann für die Basen Guanin, Adenin oder Thymin stehen. Hinter einem R kann sich ein Adenin oder Guanin verstecken und bei einem Y handelt es sich um Cytosin oder Thymin. Degenerierte Primer stellen ein Primergemisch dar, welches die Amplifikation der DNA verschiedener Stämme, die sich nur in kleinen Basenvariationen voneinander unterscheiden, ermöglicht. Diese Art von Primern wird häufig dann eingesetzt, wenn unkultivierte Mikroorganismen deren Genominformation nicht verfügbar ist, detektiert werden sollen. Die Quantifizierung erfolgte in unserem Ansatz absolut, d.h. mit Hilfe einer externen Standardkurve seriell verdünnter Standards. Die Standardkurve stellt eine Beziehung zwischen dem C_t -Wert und der Ausgangskonzentration der Gesamt-DNA dar. Die Konzentrationen der seriellen Verdünnungen umfassten dabei den Bereich, in welchem die zu detektierenden Proben zu erwarten waren. Für die Quantifizierung der allgemeinen Bakterienzahl also von 1×10^2 - 1×10^7 DNA-Kopien je μl und für die Bestimmung der DRC von 1×10^2 - 1×10^6 DNA-Kopien je μl . Um eine genaue Quantifizierung zu ermöglichen, erfolgte der Einsatz der Proben-DNA und Standards bei jeder qPCR mindestens als Duplikat. Bei jedem qPCR-Durchlauf wurden mindestens zwei Negativkontrollen (ddH_2O statt *Template*) mitgeführt. Lagen die erzielten Kopienzahlen einiger Proben hinter den C_t -Werten der Negativkontrollen, wurden sie von der Auswertung ausgeschlossen. Als zusätzliche Kontrolle wurde isolierte DNA aus einer Reinkultur der *Dehalococcoides* Spezies CBDB1 in jedem qPCR-Lauf eingesetzt. Dadurch wurde sichergestellt, dass beide Primerpaare ähnliche Werte für die gleiche Menge an Ausgangs-DNA produzieren und eine verlässliche Bestimmung des relativen Vorhandenseins von DRC gewährleistet wurde. Beim Einsatz reiner CBDB1-DNA sollte der erlangte Wert für die Kopienzahl der Bakterien-DNA also in etwa der DNA-Kopienzahl der DRC entsprechen. Tat er dies nicht, ist einer der beiden Versuchsansätze fehlerhaft gelaufen und die erfassten Werte für die DNA aus den Sedimenten wurden ebenfalls als unzuverlässig betrachtet. Das PCR-Programm startete mit einem Temperatur-*Touchdown*, um die Spezifität der DRC-Primer zu optimieren und ungewollte Fehlverknüpfungen während der PCR Reaktion zu umgehen (Don et al. 1991). Dabei wurde die Anlagerungstemperatur für die Primer in fünf aufeinander folgenden Zyklen von 65°C jeweils um $0,4^\circ\text{C}$ auf 63°C herabgesetzt. Es folgten 31-33 Zyklen mit gleich bleibender Anlagerungstemperatur für die Primer (Tab. 8)

Tab. 8: Temperaturprogramm für die qPCR

Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Zeit
Aktivierung der Polymerase	95	15 min
Allgemeiner Ablauf eines qPCR Zyklus		
Denaturierung	95	30 s
Primeranlagerung	x	30 s
Strangverlängerung	72	45 s
Primeranlagerungstemperatur		
1. Zyklus	65	30 s
2. Zyklus	64,6	30 s
3. Zyklus	64,2	30 s
4. Zyklus	63,8	30 s
5. Zyklus	63,4	30 s
6. bis 38. Zyklus	63	30 s
Schmelzkurvenanalyse	95	15 s
	60 + 0,3	1 min
	95	15 s

Die Aufzeichnung des Fluoreszenzsignals, welche durch den Farbstoff SYBR®Green I ermöglicht wurde, erfolgte jeweils am Ende der Kettenverlängerungsphase eines jeden Zyklus. SYBR®Green I interkaliert in doppelsträngige DNA-Abschnitte, wenn sich diese anhäufen kann immer mehr Farbstoff binden, d.h. die Fluoreszenz steigt proportional zum dsDNA-Gehalt. Diese Technik ist sehr flexibel und kann für verschiedene Gen-Proben verwendet werden. Die Unspezifität des Farbstoffes kann jedoch auch zu falsch positiven Ergebnissen führen (Wong et al. 2005), deshalb wurde nach jedem qPCR-Lauf eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Dabei wurde der Reaktionsansatz in 0,3°C Schritten von 60 auf 95°C kontinuierlich erhitzt und dabei das Fluoreszenzsignal aufgenommen. Wenn Unregelmäßigkeiten in den Schmelzkurven zu erkennen waren, wurden die PCR-Produkte zusätzlich mit Hilfe einer Standard-Agarosegelelektrophorese überprüft.

2.4.2 Allgemeine Darstellung und Auswertung der Ergebnisse einer qPCR

Für die Darstellung der Amplifikationskurve wurde das detektierte Fluoreszenzsignal als ΔR_n gegen den Zyklus aufgetragen. ΔR_n berechnet sich dabei aus der Differenz des R_n Wertes einer Probe und dem Hintergrundrauschen. R_n ist dabei der Quotient aus der Intensität der Fluoreszenzemission des Reporterfarbstoffes und der des Passivfarbstoffes (Wong et al. 2005). Das Hintergrundrauschen wird durch die Basislinie repräsentiert.

Diese wird in den ersten Zyklen definiert, in denen nur eine unwesentliche Änderung der Fluoreszenz stattfindet. Die Amplifikationskurven weisen eine deutliche S-Form auf, dabei geht die anfängliche exponentielle Phase schließlich in ein Plateau über (Abb. 5). Während die Amplifikation in der exponentiellen Phase relativ stabil verläuft, nimmt sie zu späteren Zyklen aufgrund der Limitierung der vorhandenen Primer, dNTP's und der Polymerase Aktivität sowie der Anhäufung von PCR Produkten immer stärker ab (Wong et al. 2005). Die wahre Reaktionskinetik der Probe wird also durch den exponentiellen Teil der Kurve repräsentiert, in welchem im Idealfall eine Verdopplung der Amplifikate pro Zyklus stattfindet. Im exponentiellen Teil der Kurve wurde ein Fluoreszenzschwellenwert durch die Software automatisch vorgeschlagen, er konnte aber auch manuell festgelegt werden. Der Zyklus, in welchem das detektierte Signal diesen Wert erstmalig überschreitet, wird als Schwellenwertzyklus (C_t -Wert) bezeichnet. Für das Erstellen einer Standardgeraden wurden die Konzentrationswerte der eingesetzten Standards logarithmisch transformiert und gegen den entsprechenden detektierten Schwellenwertzyklus aufgetragen (Abb. 6). Aus dem Anstieg der generierten Standardgeraden lässt sich die Amplifikationseffizienz des jeweilig eingesetzten Primerpaares mittels der Formel 1 berechnen. Ein Anstieg der Geraden von -3,32 entspricht einer idealen Amplifikationseffizienz von 100 %. Im Realfall werden jedoch nicht alle DNA Fragmente amplifiziert. Im Allgemeinen werden Effizienzen zwischen 90 % und 110 % angestrebt (tech note 5859 BIORAD). Der ermittelte C_t -Wert einer unbekannten Probe wird schließlich mit Hilfe der Standardgeraden zur Ermittlung der ursprünglichen Kopienzahl herangezogen. Der C_t -Wert ist dabei indirekt proportional zur Ausgangs-DNA-Konzentration einer Probe. Der spezifische Schmelzpunkt eines PCR-Produktes, bei dem die doppelsträngige DNA denaturiert, ist durch einen rapiden Abfall der Fluoreszenz gekennzeichnet (Abb. 7). Die Detektionssoftware berechnet die erste Ableitung am Wendepunkt der aufgenommenen Fluoreszenzsignalkurven, was in einen Peak am spezifischen Schmelzpunkt der jeweilig analysierten Probe resultiert (Abb. 8). Ein zusätzlicher Peak, bei Temperaturen kleiner der spezifischen Schmelztemperatur des gewünschten Produktes, weist auf Primerdimere hin. Mehrere Peaks mit unterschiedlichen Schmelztemperaturen treten bei der Bildung unspezifischer Produkte auf. (QuantiTect SYBR Green PCR Handbook)

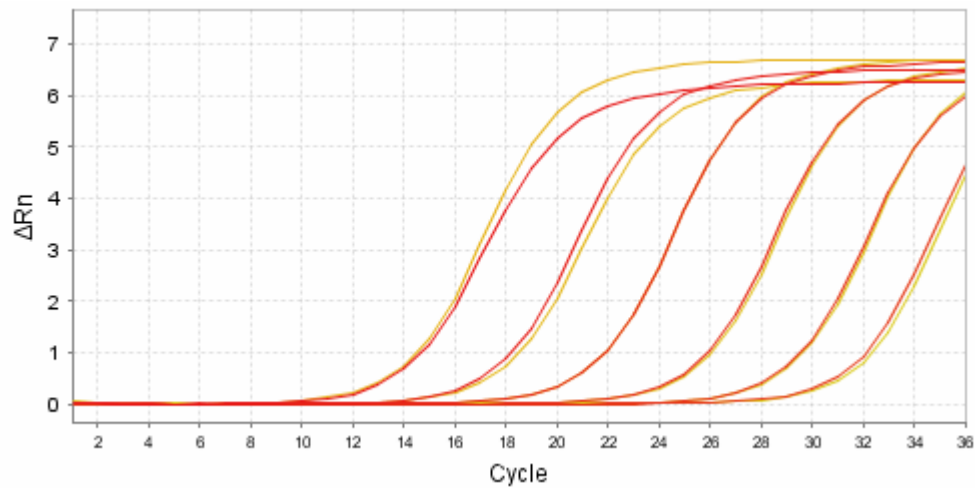


Abb. 5: Amplifikationskurven einer Standardreihe (von links nach rechts: 1×10^7 bis 1×10^2 Kopien/ μ l), welche jeweils in zwei parallelen Ansätzen mittels der DRC-Primer generiert wurden.

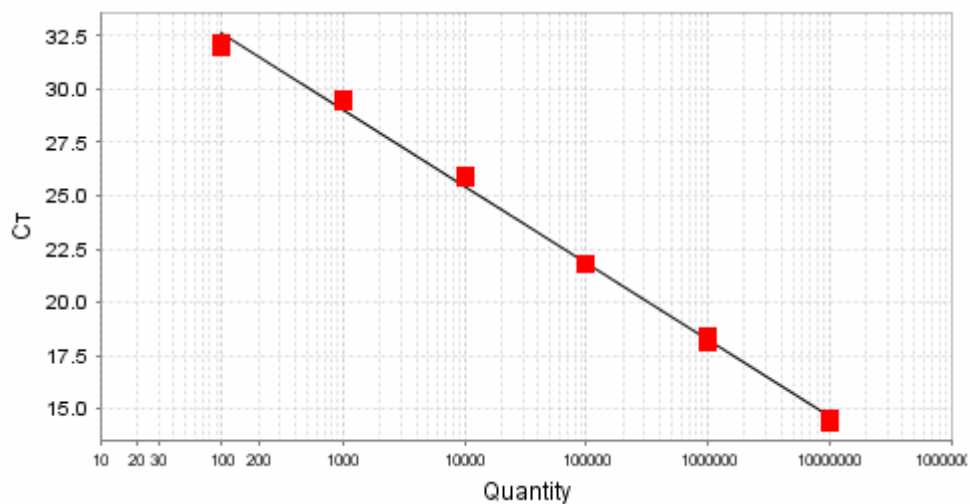


Abb. 6: Standardkurve, welche durch Amplifikation der Standards 1×10^7 bis 100 Kopien/ μ l mit den DRC-Primern generiert wurde. Die absolute Anzahl des *Template* in der ursprünglichen Probe ist über den Schwellenwertzyklus (Ct-Wert) aufgetragen.

$$E = 10^{-1/m} - 1 \quad m = \text{Anstieg der Standardgeraden}$$

Formel 1: Berechnung der Primereffizienz

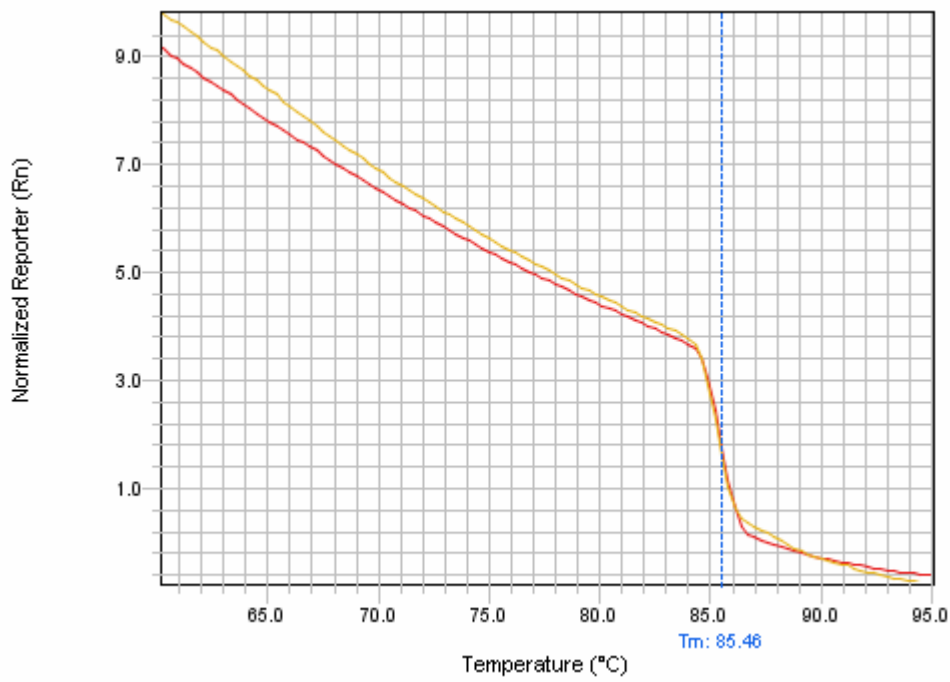


Abb. 7: Während der Schmelzkurvenanalyse detektiertes Fluoreszenzsignal einer mittels DRC-Primern amplifizierten 10^7 Kopien/ μ l Standardprobe.

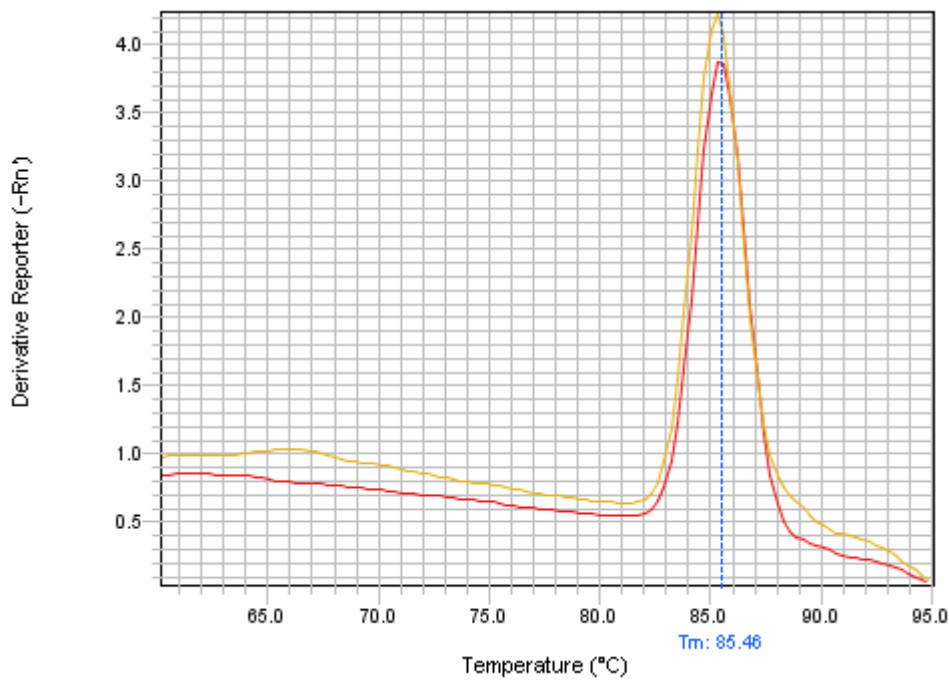


Abb. 8: Schmelzkurve einer mittels DRC-Primern amplifizierten 10^7 Kopien/ μ l Standardprobe.

2.5 Agarosegelelektrophorese

Zur Kontrolle der Spezifität einer Real Time PCR wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Es wurde ein 1 %-iges Agarosegel hergestellt. Dazu wurden 100 ml TAE (1x) Puffer auf 1 g Biozym LE Agarose (Oldendorf, Deutschland) in einen Erlenmeyerkolben gegeben und in der Mikrowelle in kurzen Zeitintervallen erhitzt bis sich eine homogene Lösung ergab. Zwischendurch wurde der Kolben immer wieder geschwenkt um einen Siedeverzug zu unterbinden. Die Agarose-Lösung wurde in eine Form mit Kamm gegossen und ca. 30 min ausgehärtet, der Kamm anschließend entfernt und das Gel in eine mit TAE (1x) gefüllte Elektrophorese-Kammer eingesetzt. Dabei ist darauf zu achten, dass das Gel komplett mit diesem Puffer bedeckt ist. Damit die zu untersuchende Proben-DNA besser in die Taschen des Gels absinkt, wurden 5 µl dieser vorher mit 2 µl 6 x Ladepuffer (Fermentas, St. Leon-Rot) vermennt und jeweils 5 µl des Gesamtgemisches in die Kammer des Gels pipettiert. Auf jedes Gel wurde in die erste Kammer ein Gene Ruler™ 100bp Plus DNA ladder (Fermentas, St. Leon-Rot) mit Strängen bekannter Größe (3000, 2000, 1500, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 [bp]) pipettiert, um eine Abschätzung der Amplifikatlänge der zu untersuchenden Probe zu ermöglichen. Die Elektrophorese fand bei 90 V für 45 min statt. Nach erfolgter Auftrennung wurde das Gel für 10 min in einer 3 %-igen Ethidiumbromidlösung gefärbt, eine Minute in ddH₂O gewaschen und danach unter ultraviolettem Licht betrachtet und gegebenenfalls abfotografiert.

2.6 DNA-Isolierung aus Reinkulturen und Sedimentproben

Die DNA-Extraktion der Proben aus CBDB1-Reinkulturen erfolgte mit Hilfe des NucleoSpin® Tissue Kit (Macherey-Nagel, Düren). Die Zelllyse wurde nach dem Unterstützungsprotokoll für Bakterien und anschließend nach dem Standardprotokoll durchgeführt. Jede Extraktion erfolgte im Doppelansatz. Die Isolierung der bakteriellen DNA aus den Sedimentproben von Aarhus, Chile, Neapel, Irland und der Nordsee wurden nach dem Protokoll des „Fast DNA Spin Kit for Soil“ (MP Biomedicals, Solon (USA)) ausgeübt. Die Extraktion für jede Sedimentprobe fand dabei im Dreifachansatz statt. Es wurde jeweils 1 g Sediment der weichen feuchten Proben von der Nordsee, Aarhus, Neapel, Chile sowie Irland 18 eingesetzt und 500 mg der harten trockenen Irland 17-Probe. Zusätzlich wurde noch eine DNA-Kontrolle mitgeführt. Für diesen wurden anstelle der Sedimentprobe 500 ml des NatriumphosphatPuffers aus dem Kit verwendet.

Entgegen der Vorschrift des Protokolls wurde zuerst der MT Puffer hinzu gegeben und anschließend 500 µl des Natriumphosphat Puffers. Nach der ersten Homogenisierung im FastPrep[®] Instrument (SAVANT Instruments, NY) wurden die Röhrchen für 10 min in der Centrifuge 5415 R (Eppendorf) zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein sauberes 2 ml Eppendorfgefäß überführt und dem alten Röhrchen abermals 480 µl Natriumphosphat Puffer zugesetzt, Schritt vier und fünf wiederholt und der Überstand ebenfalls in das neue Eppendorfgefäß dazu gegeben. Bis einschließlich Schritt neun erfolgte die Extraktion nach dem Protokoll. Im Schritt zehn wurden statt 500 µl Überstand 700 µl verworfen. Zum Schluss wurde die DNA mittels 50 µl DES (DNA-Eluierungslösung) gewaschen. Vor dem Einsatz für die qPCR wurden jeweils 1:100 Verdünnungen der Extrakte hergestellt. Die Extraktion der Proben aus Peru, dem Schwarzen Meer und Sumatra wurden wie folgt durchgeführt. Die DNA wurde von marinen Sedimenten unter Verwendung des Fast DNA Spin Kit for Soil (MP Biomedicals) nach den Herstelleranweisungen mit einigen kleinen Veränderungen im Doppelansatz extrahiert. Für jede Probe wurden 0,8 g Sediment abgewogen und 780 µl Natriumphosphat Puffer zugegeben. Nach dem DNA-Bindungsschritt wurde die Säule für 30 Minuten stehen gelassen, damit die DNA sich absetzen kann. Jede Probe wurde mit 100 µl DES gewaschen. Für Sedimente aus Peru wurde die DNA extrahiert und anschließend mit Hilfe des Microcon YM-100 Gerätes (Amicon) konzentriert und wieder in 60 µl ddH₂O verdünnt. Die Sedimente des schwarzen Meeres und von Sumatra wurden jeweils in 40 µl ddH₂O verdünnt. Alle DNA-Extrakte wurden 1:10 verdünnt, bevor sie für die qPCR eingesetzt wurden. Alle Proben wurden nach der Extraktion unverzüglich bei -20°C gelagert.

2.7 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration einer Probe

Der DNA-Gehalt in den Sedimentextrakten wurde mit dem Spektralphotometer NanoDrop ND 1000 (peqlab Biotechnologie GmbH, Deutschland) bestimmt. Dazu wurde das Gerät zuerst mit 1 µl ddH₂O und anschließend mit dem DES Waschpuffer des DNA-Extraktionskits kalibriert. Das DNA-Extrakt wurde gevortext und anschließend 1 µl zur Messung aufgetragen. Die Messung der optischen Dichte erfolgte bei einer Wellenlänge von 260 nm. Die Software berechnete aus den ermittelten Werten die Nukleinsäurekonzentration (Formel 2). Zur Bestimmung des Reinheitsgrades einer Probe wurde gleichzeitig eine Messung bei 230 nm (Adsorption durch RNA) und 280 nm (Adsorption durch Proteine) durchgeführt. Die Verhältnisse der gemessenen Adsorptionen bei 260/280 [nm] und 260/230 [nm] geben Aufschluss über eventuelle Verunreinigungen.

Der Wert für 260/280 [nm] sollte idealer Weise zwischen 1,7 und 1,9 liegen. Ist er niedriger ist die Probe mit Proteinen verunreinigt. Ist er jedoch größer handelt es sich um eine RNA-Kontamination. Das Verhältnis der Adsorptionen bei 260 nm und 230 nm sollte stets größer als zwei sein, da man sonst von einer organischen Kontamination (Phenol, Toluol, Kohlenhydrate, Peptide,...) ausgehen kann.

$$c \text{ [ng/}\mu\text{l]} = \text{Adsorption bei 260 nm} \times V \times F$$

c = Konzentration der Ausgangslösung
 F = Multiplikationsfaktor (dsDNA = 50)
 V = Verdünnungsfaktor

Formel 2: Bestimmung der Nukleinsäurenkonzentration

3 Ergebnisse

3.1 Detektion und Quantifizierung von CBDB1 mittels Fluoreszenzmikroskopie

3.1.1 Die Methode der Zellzahlbestimmung

Um die Methodik der Zellzählung mit dem Fluoreszenzmikroskop hinsichtlich ihrer Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit zu überprüfen, wurde eine Verdünnungsreihe angesetzt. Zuerst wurde die Zellkonzentration einer CBDB1-Kultur mittels mikroskopischer Zählung erfasst. Da die Zellkonzentration jedoch zu gering ausfiel, wurde ein Konzentrat dieser Kultur hergestellt. Dafür wurden 30 ml über einen CA 0,2 Filter gespült und die Zellen anschließend mit 2 ml reinem Medium wieder abgelöst. Es wurde die Zellzahl dieses gewonnenen Konzentrates bestimmt und daraus vier verschiedene Verdünnungsstufen angesetzt (Tab. 9). Von jeder Verdünnung wurden drei unabhängige Proben (a, b, c) genommen und deren Zellzahl mit der Methode der mikroskopischen Zählung bestimmt. Dabei wurde beobachtet, dass die Zellkonzentration mit steigender Verdünnung einer Probe abnimmt (Tab. 10 und Abb. 9). Es wurde die Trendlinie mit dem besten Korrelationskoeffizienten bestimmt, welcher zeigt, dass ein linearer Zusammenhang zwischen den Verdünnungen und den ermittelten Zellkonzentrationen besteht (Abb. 10). Die durchschnittliche errechnete Standardabweichung für dieses Experiment liegt bei 26%. Es wurden im Rahmen dieser Arbeit über 96 weitere Proben mikroskopisch gezählt. Für jede Probe wurden dabei 10 Bilder aufgenommen. Auf Basis der ermittelten Zellkonzentrationen dieser Proben wurde daraufhin eine mittlere Standardabweichung der erzielten Konzentrationswerte von 27,3% errechnet.

Tab. 9: Herstellung der Verdünnungen aus dem Zellkonzentrat.

Probenname	Relative Zellmenge [%]	Konzentratvolumen	Mediumvolumen
10	100	400 µl	0 µl
8	80	320 µl	80 µl
6	60	240 µl	160 µl
4	40	160 µl	240 µl
2	20	80 µl	320 µl

Probe 10 stellt das Zellkonzentrat dar. Proben 8-2 die entsprechenden Verdünnungen.

Tab. 10: Mittelwerte und Standardabweichungen der Verdünnungsproben

Probenname	Zellzahl [Zellen/ml]	SD	Zellanteil bezogen auf das Konzentrat	Erwarteter Zellanteil
10	3,63E+07	29%	100%	100%
8	2,80E+07	17%	77%	80%
6	1,90E+07	31%	52%	60%
4	1,23E+07	27%	34%	40%
2	8,37E+06	28%	23%	20%

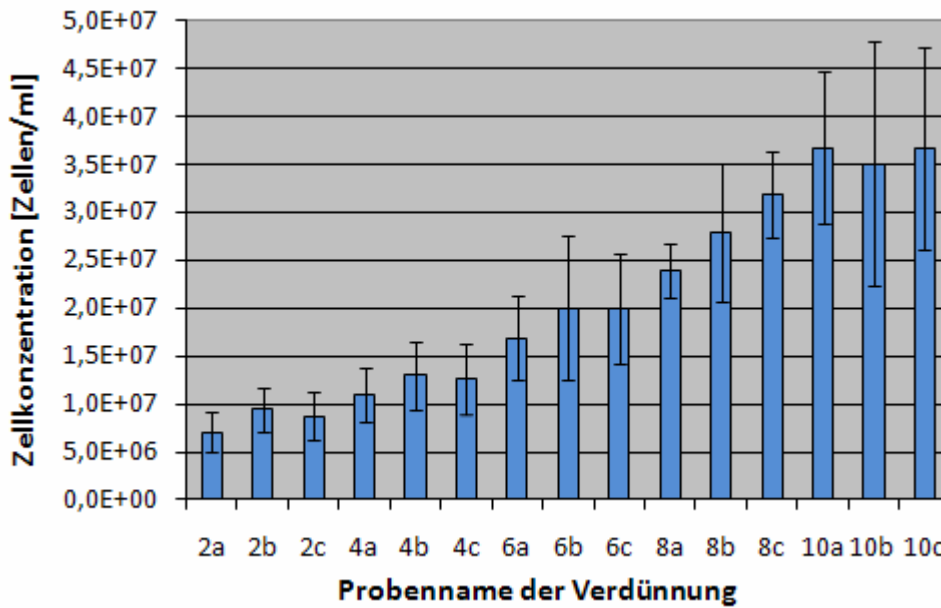


Abb. 9: Zellzahlen der verschiedenen Verdünnungsproben einer aufkonzentrierten CBDB1-Kultur. Jeder blaue Balken stellt den Mittelwert und jeder schwarze Balken die Standardabweichung für jeweils 10 aufgenommene Bilder dar.

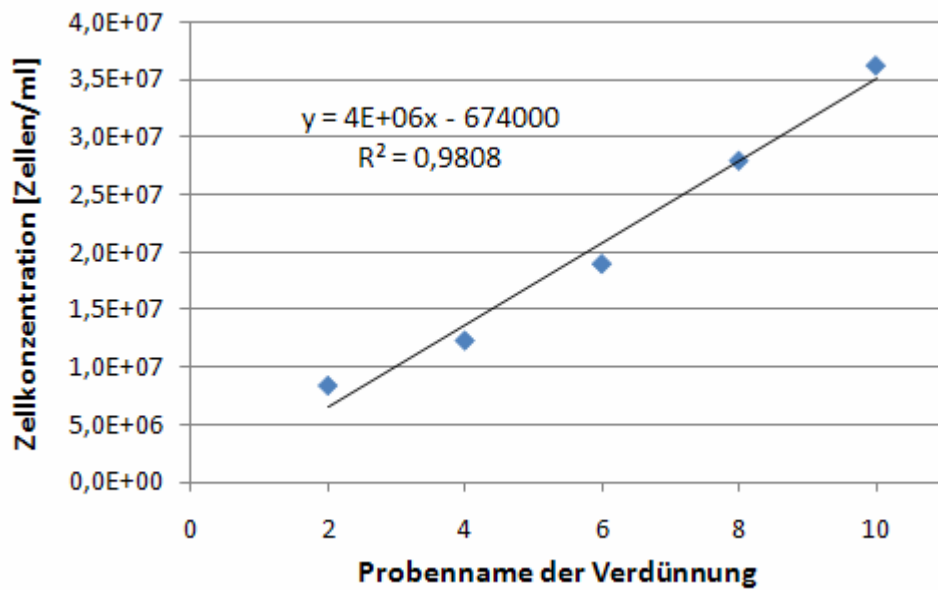


Abb. 10: Zellzahlen der Verdünnungsproben. R^2 : linearer Korrelationskoeffizient.

3.1.2 Anwendungen der Zählmethode zum Monitoring von Anreicherungen

3.1.2.1 Zentrifugation

Um die Verteilung der Zellen innerhalb einer Zellsuspension nach der Zentrifugation zu bestimmen, wurden 5 ml zweier CBDB1-Kulturen jeweils in einem konischen 15ml Zentrifugationsröhrchen der Firma Falcon, auch Falcongefäß genannt, zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend jeweils milliliterweise abpipettiert und der Zellgehalt dieser Einzelfragmente mittels mikroskopischer Zählung bestimmt. Nach der Zentrifugation befanden sich die meisten Zellen in den letzten beiden Millilitern des Falcongefäßes (Tab. 11).

Tab. 11: Zellkonzentrationen in den letzten beiden Millilitern eines Falcongefäßes nach der Zentrifugation.

Bezeichnung	Volumen	c [Zellen/ml]	Ausbeute [%]	F _a
Probe 1	5 ml	2,66E+06	100	1
4. ml	1 ml	1,47E+06	11	0,55
5. ml	1 ml	1,77E+07	133	6,64
Probe 2	5 ml	3,33E+06	100	1
4. ml	1 ml	1,20E+06	7	0,36
5. ml	1 ml	1,70E+07	102	5,11

In der 1. und 4. Zeile ist die Zellkonzentration der jeweiligen untersuchten Probe vor der Zentrifugation aufgelistet. Danach folgen die jeweiligen ermittelten Werte aus dem vorletzten und letzten verbleibenden Millilitern des Falcongefäßes nach der Zentrifugation. In den ersten drei Millilitern lag der Zellgehalt unterhalb der Detektionsgrenze. Es wurden jeweils die errechneten Zellausbeuten und Anreicherungsfaktoren (F_a) bezogen auf die Ausgangszellkonzentration vor der Zentrifugation dargestellt.

Um nachzuprüfen, ob sich nach der Zentrifugation eines beliebigen Kulturvolumens die meisten Zellen stets in den letzten 20% des Suspensionsvolumens befinden und welche Zellverluste zu verzeichnen sind, wurden dreimal je 50 ml derselben Zellkultur in ein Falcongefäß überführt und zentrifugiert. Danach wurden jeweils 40 ml Überstand verworfen und die Zellkonzentration in den jeweils verbleibenden 10 ml bestimmt. Die Zellkonzentration des Dreifachansatzes der analysierten Pellets weisen hohe Schwankungen untereinander auf (Tab. 12).

Tab. 12: Im Dreifachansatz bestimmte Zellkonzentrationen in den letzten 10 ml eines Falcongefäßes nach der Zentrifugation.

Bezeichnung	Volumen	c [Zellen/ml]	Gesamtzellen	Ausbeute [%]	F _a
Ausgangskultur	50 ml	3,67E+06	1,83E+08	100	1
Probe a	10 ml	1,67E+07	1,67E+08	91	4,55
Probe b	10 ml	1,93E+07	1,93E+08	105	5,27
Probe c	10 ml	1,27E+07	1,27E+08	69	3,45

Es wurden die errechneten Gesamtzellzahlen in den letzten 10 ml einer jeden Probe, sowie die dazugehörigen Zellausbeuten und Anreicherungsfaktoren (F_a) bezogen auf die Ausgangskultur dargestellt.

Die nachfolgenden zwei durchgeführten Zentrifugationsexperimente orientieren sich am Protokoll zur Zellgewinnung von Kelly Fletcher (Anhang 1), welches als Bearbeitungsgrundlage herangezogen und entsprechend optimiert wurde.

1. Experiment:

Eine CBDB1-Kultur, deren Zellzahl mittels mikroskopischer Zählung bestimmt wurde, diente als Ausgangskultur für dieses Experiment. Von dieser wurden sechsmal je 48 ml Kulturmedium in ein Falcongefäß überführt und zentrifugiert. Jeweils circa 43 ml Überstand wurden verworfen, die Pellets in einem Falcongefäß zusammengeführt (1. Pellet), dessen Zellkonzentration bestimmt und abermals zentrifugiert. Danach wurde soviel Überstand abgenommen, bis nur noch 2 ml Zellsuspension (2. Pellet) vorhanden waren, deren Zellgehalt wurde ebenfalls erfasst. Die größten Zellverluste sind bis zum Erhalt des ersten Pellets zu verzeichnen. Beim Herstellen des zweiten Pellets sind keinerlei Verluste erkennbar, der Zählwert ist sogar höher als vor der abermaligen Zentrifugation. Zieht man die Ungenauigkeit des Zählprogramms in Betracht, kann diese Abweichung jedoch vernachlässigt werden. Auffallend erscheint die Tatsache, dass der zweite abzunehmende Überstand auch über 90% des Gesamtvolumens ausmacht, aber diesmal keinerlei Zellen verloren gehen. (Tab. 13)

Tab. 13: Übersicht der Zellkonzentrationen nach mehrmaliger Zentrifugation (Experiment1)

Bezeichnung	Volumen	c [Zellen/ml]	Gesamtzellen	Ausbeute [%]	F _a
CBDB1 Kultur	288 ml	5,40E+06	1,56E+09	100	1
1. Pellet	30 ml	1,26E+07	3,78E+08	24	2,33
2. Pellet	2 ml	2,10E+08	4,20E+08	27	38,9

2. Experiment:

Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der erzielten Werte aus dem 1. Experiment wurde ein weiteres Experiment durchgeführt. Um den Aufwand zu minimieren, wurden diesmal nur 100 ml einer CBDB1-Kultur verwendet. Dabei wurden jeweils 50 ml in je einem Falcongefäß zentrifugiert. Es wurden jeweils circa 45 ml Überstand abgenommen, die Pellets in ein 15 ml Falcongefäß zusammengefügt, gezählt und abermals zentrifugiert. Nun wurde der Überstand erneut abgenommen und die Zellzahl des verbliebenen Pellets bestimmt. Auch hier wurden ähnliche Zellverluste bis zum Erhalt des ersten Pellets wie in Experiment 1 verzeichnet, während nach dem zweiten Zentrifugationsschritt fast alle Zellen erhalten blieben (Tab. 14).

Tab. 14: Übersicht der Zellkonzentrationen nach mehrmaliger Zentrifugation (Experiment2)

Bezeichnung	Volumen	c [Zellen/ml]	Gesamtzellen	Ausbeute [%]	F _a
CBDB1 Kultur	100 ml	3,23E+06	3,23E+08	100	1
1. Pellet	9,5 ml	9,93E+06	9,44E+07	29	3,07
2. Pellet	0,83 ml	1,10E+08	9,13E+07	28	34

3.1.2.2 Filtration

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Zellrückhaltevermögen einfach handhabbarer Spritzenvorsatzfilter aus verschiedenen Materialien und mit unterschiedlicher Porengröße getestet, um deren Anwendung zur Abtrennung von CBDB1-Zellen aus Reinkulturen abschätzen zu können.

Um eine Methode zur Bestimmung des Rückhaltevermögens verschiedener Spritzenvorsatzfilter zu entwickeln, wurden 10 ml einer CBDB1-Kultur über einen CA 0,2 Filter geleitet und die Zellen anschließend mit reinem Medium milliliterweise wieder von der Membran abgespült und in separaten Eppendorfgläsern aufgefangen. Anschließend wurde die Zellzahl der einzelnen Fraktionen mikroskopisch bestimmt. Da sich gezeigt hatte, dass sich die Zellen hauptsächlich in den ersten fünf zurückgespülten Millilitern befinden (Abb. 11 und Tab. 15), wurden in den nächsten Experimenten stets 5 ml Medium zur Rückgewinnung der Zellen von der Filtermembran verwendet.

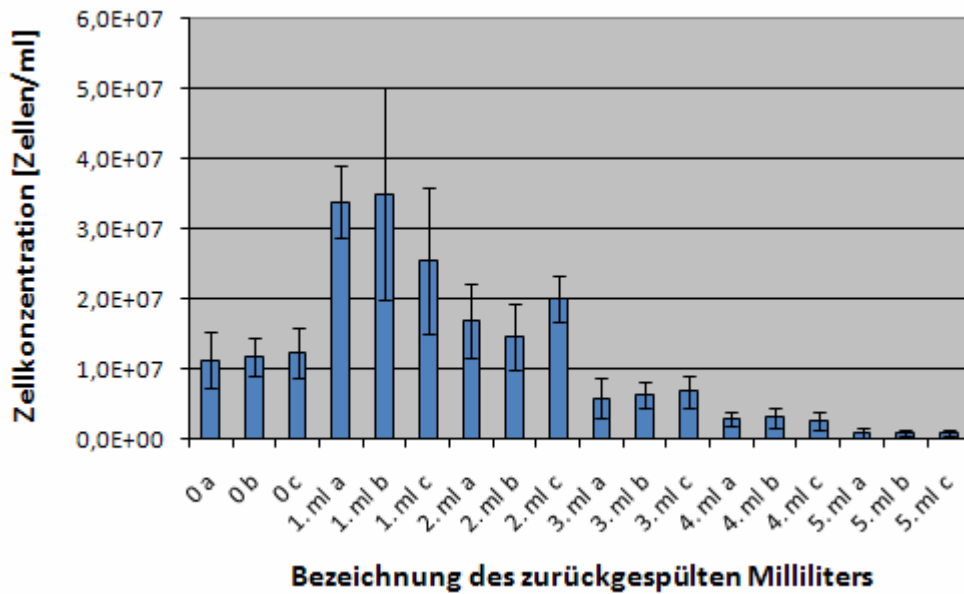


Abb. 11: Zellkonzentration je zurückgespülter Milliliter. Die Balken 0 a-c symbolisieren die Zellkonzentrationen der Ausgangskultur vor der Rückspülung. Die Zellkonzentration des sechsten Milliliters, mit welchem der Filter gespült wurde, lag unterhalb der Detektionsgrenze der Zählmethode, ebenso wie die des Filtrates.

Tab. 15: Zellgehalt je zurückgespültem Milliliter

Zurückgespült	Volumen	Gesamtzellen	Ausbeute [%]	F _a
Ausgangskultur	10 ml	1,16E+08	100	1
1. ml	1 ml	3,13E+07	26,86	2,69
2. ml	1 ml	1,73E+07	14,86	1,04
3. ml	1 ml	6,30E+06	5,43	0,54
4. ml	1 ml	2,80E+06	2,40	0,24
5. ml	1 ml	8,30E+05	0,70	0,07

Die Tabelle zeigt die errechneten Gesamtzellzahlen im analysierten zurückgespülten Milliliter, sowie die dazugehörigen Zellausbeuten und Anreicherungsfaktoren (F_a) bezogen auf die Ausgangskultur.

Um den Einfluss des über den Filter geleiteten Kulturvolumens auf die Konzentration der Zellen im Eluat zu untersuchen, wurden jeweils 5 ml, 15 ml und 25 ml einer Kultur über einen CA 0,2 Filter gefiltert und mit je einem Milliliter Medium zurückgespült. Der Zellgehalt dieses zurückgespülten Milliliters wurde anschließend mittels mikroskopischer Zählung bestimmt. Die Menge des zuvor gefilterten Kulturmediums hat keinen Einfluss auf die Konzentration der im Eluat gefundenen Zellen. Die Zellausbeuten waren in etwa alle

gleich, denn es befand sich jeweils ein Drittel der gefilterten Zellen im ersten zurückgespülten Milliliter (Tab. 16).

Tab. 16: Zellgehalt der zurückgespülten Milliliter

Volumen	Gesamtzellen	c [Zellen/ml]	Ausbeute [%]	F _a
Ausgangskultur	1,50E+07	1,50E+07	100	1
5 ml	7,50E+07	2,43E+07	32	1,62
15 ml	2,25E+08	9,10E+07	40	6,07
25 ml	3,75E+08	1,18E+08	31	7,87

Nachfolgend wurden verschiedene Spritzenvorsatzfilter auf ihr Zellrückhaltevermögen getestet. Dafür wurden jeweils 10 ml Kulturmedium gefiltert und 5 ml Medium benutzt, um die Zellen wieder vom Filter zu waschen. Alle Experimente erfolgten jeweils im Dreifachansatz. Es wurde dabei die Zellkonzentration der eingesetzten Kulturen sowie der jeweiligen zurückgespülten Retentate (z.Retentat) und Permeate mikroskopisch bestimmt.

Tab. 17: Zellrückhaltevermögen verschiedener Spritzenvorsatzfilter.

Filter	Probe	Volumen	Ausbeute [%]	F _a
PES 0,1	Ausgangskultur	10 ml	100	1
	z. Retentat	5 ml	97	1,95
	Zellverlust		3	
CA 0,2	Ausgangskultur	10 ml	100	1
	z. Retentat	5 ml	69	1,37
	Zellverlust		30	
CA 0,45	Ausgangskultur	10 ml	100	1
	z. Retentat	5 ml	36	0,73
	Permeat	10 ml	15	0,15
	Zellverlust		49	
CA 0,65	Ausgangskultur	10 ml	100	1
	z. Retentat	5 ml	7	0,75
	Permeat	10 ml	37	0,07
	Zellverlust		56	

z. Retentat: zurückgespültes Retentat. In den Permeaten der PES 0,1 und CA 0,2 lagen die Zellgehalte unterhalb der Detektionsgrenze.

Wie zu erwarten war, sinkt das Zellrückhaltevermögen mit steigender Porengröße (Tab. 17). Um auszuschließen, dass das Material der Filtermembran das Rückhaltevermögen der Filter beeinflusst, wurden Spritzenvorsatzfilter mit gleicher nominellen Porengröße

getestet, die aus verschiedenen Membranmaterialien aufgebaut waren. Die Zellausbeuten für die getesteten Membranmaterialien sind in etwa gleich groß (Tab. 18).

Tab. 18: Zellausbeute im zurückgespülten Retentat (z. Retentat) in Abhängigkeit des Filtermembranmaterials

Filtermaterial	Porengröße	Probe	Volumen	Ausbeute [%]	F _a
Celluloseacetat	0,2 µm	Ausgangskultur	10 ml	100	1
		z. Retentat	5 ml	69	1,37
		Zellverlust		30	
Polyethersulfon	0,2 µm	Ausgangskultur	10 ml	100	1
		z. Retentat	5 ml	70	1,41
		Zellverlust		30	

3.1.2.3 Vakuumdestillation

Entsprechend der Methode der Vakuumdestillation wurden 30 ml einer CBDB1-Kultur circa 40 min auf 8,5 oder 4,5 ml verdampft und die Zellkonzentrationen vor und nach diesem Prozess mikroskopisch analysiert. Parallel dazu wurde dieselbe Menge CBDB1-Kultur mittels eines CA 0,2 Spritzenvorsatzfilter gefiltert und jeweils 8,5 ml oder 4,5 ml Medium zurückgespült und die Zellzahl im Eluat bestimmt. Die erzielten Zellkonzentrationen mittels Vakuumdestillation wurden anschließend denen der Filtration gegenübergestellt. Die mittels Filtration erreichten Zellausbeuten lagen dabei etwas höher als unter Verwendung des Vakuumverdampfers (Tab. 19). In den mit Hilfe der Vakuumdestillation gewonnenen Konzentraten, wurden eine starke Rosa- oder Blaufärbung sowie die Bildung eines Niederschlages beobachtet. Bei der Filtration dagegen waren keine Anhäufungen zu erkennen (Abb. 12). Es wurde ebenfalls beobachtet, dass sich die Zellen, welche durch die Vakuumdestillation gewonnen wurden, schlechter mit SYBR® Green I anfärben ließen. Trotz des Einsatzes der doppelten Menge an Färbereagenz verblichen die Zellen zusätzlich rascher unter dem Einfluss des Fluoreszenzlichtes. Unter dem Fluoreszenzmikroskop wurde ein starkes Hintergrundleuchten beobachtet (Abb. 13).

Tab. 19: erzielte Zellkonzentrationen in unterschiedlichen Volumina nach Anreicherung mittels Vakuumdestillation und mittels Filtration aus der gleichen Ausgangskultur.

Probe	Volumen	c [Zellen/ml]	Gesamtzellen	Ausbeute [%]	F _a
Ausgangskultur	30 ml	2,47E+07	7,40E+08	100	1
Filtration	8,5 ml	3,93E+07	3,34E+08	45	1,59
Vakuumverdampfer	8,5 ml	3,13E+07	2,66E+08	36	1,27
Filtration	4,5 ml	5,67E+07	2,55E+08	34	2,3
Vakuumverdampfer	4,5 ml	4,37E+07	1,96E+08	27	1,77



Abb. 12: Von links nach rechts: gefilterte Zellkultur, aerob gewordenes Zellkonzentrat, anaerobes Zellkonzentrat

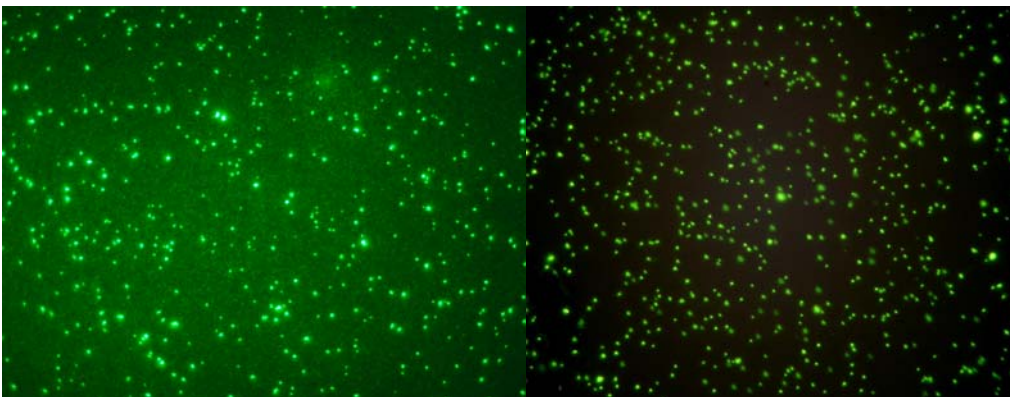


Abb. 13: Mikroskopische Aufnahme des Zellkonzentrates vom Stamm CBDB1. Links) nach Aufkonzentrierung durch Vakuumverdampfung. Rechts) nach Aufkonzentrierung durch Filtration.

3.2 Detektion und Quantifizierung von DRC in Sedimenten mittels qPCR

Ein verlässliches qPCR-Ergebnis ist von einer Reihe an Faktoren abhängig. Von der Spezifität und Konzentration der eingesetzten Primer, sowie deren Anlagerungstemperatur an die eingesetzte *Template*-DNA und dem qPCR-Temperaturprogramm. Die Qualität und Reinheit der als *Template* eingesetzten DNA und der *Mastermix*-Komponenten (Polymerase, dNTP's, MgCl-Ionen,...) sowie die Konzentrationen dieser einzelnen Bestandteile bestimmen ebenfalls das Gelingen einer Reaktion. Auch die Größe des zu generierenden Produktes hat einen Einfluss auf die Amplifizierungsreaktion (Wong et al. 2005). Um die Methode zur Bestimmung des Anteils an DRC zur Gesamtbakterienzahl in Sedimenten mit der qPCR aufzubauen, wurden verschiedene Läufe durchgeführt. Dabei wurde versucht, die genannten Einflussfaktoren zu berücksichtigen und das Verfahren soweit zu optimieren, dass verlässliche Resultate produziert werden konnten.

3.2.1 Verwendete CBDB1-Kontroll-DNA

Es wurden Zellen aus einer Kultur im Dreifachansatz (CBDB1 a-c) auf gleiche Weise extrahiert. Dabei ergaben sich nach der doppelten Messung mit dem NanoDrop ND 1000 jeweils unterschiedliche Mittelwerte für den DNA-Gehalt der Extrakte (Tab. 20). Es wurde CBDB1-DNA aus einer weiteren Kultur extrahiert. Das Extrakt erhielt anschließend die Bezeichnung CBDB1 d. Die gemessenen DNA-Gehalte für die Proben CBDB1 a-c, welche Triplikate darstellen, zeigten deutlich, dass trotz gleicher Prozedur unterschiedliche DNA-Konzentrationen nach der Extraktion erhalten wurden. Die Quotienten der Absorptionswerte gemessen bei 230 nm, 260 nm und 280 nm deuteten auf eine Verunreinigung aller Extraktes mit Proteinen bzw. organischen Verbindungen hin.

Tab. 20: Adsorptionsmesswerte extrahierter CBDB1-DNA

Bezeichnung	DNA Gehalt [ng/ μ l]	260/280	260/230
CBDB1 a	30,95	1,42	0,74
CBDB1 b	196,55	1,41	0,75
CBDB1 c	443,05	1,42	0,77
CBDB1 d	2,60	1,03	0,66

Die Verhältnisse der gemessenen Adsorptionen bei 260 nm/280 nm und 260 nm/230 nm geben Aufschluss über den Reinheitsgrad einer DNA-Probe (siehe 2.6.1.).

3.2.2 Bestimmung der optimalen Anlagerungstemperatur der Primerpaare

Für beide Ansätze, den zur Bestimmung der Gesamtbakterienzahl und den zur Bestimmung der DRC, wurden anfänglich zwei verschiedene Temperaturprogramme eingesetzt. Während für die Quantifizierung der DRC eine *Touchdown* PCR von 65°C auf 63°C durchgeführt wurde, wurde als Anlagerungstemperatur für die universellen Bakterienprimer auf Basis ihrer Schmelztemperaturen 60°C gewählt. Dies führte jedoch zu Effizienzen der universellen Bakterienprimer von über 100%. Da sich gezeigt hatte, dass dies auf die Bildung unspezifischer Produkte zurückzuführen war, wurde die Anlagerungstemperatur für die Bakterienprimer erhöht. Um möglichst gleiche Reaktionsbedingungen für beide Versuchsansätze zu schaffen und aus praktischen Aspekten wurde ein Versuch mit einem *Touchdown*-Temperaturprogramm von 65-63°C für beide Primerpaare durchgeführt. Da die Änderung des Programms zur Anlagerungstemperatur zu einer Verbesserung der Effizienzen der Bakterienprimer führte, wurde in weiteren Experimenten schließlich das *Touchdown*-Temperaturprogramm sowohl für die DRC- also auch für die Bakterienprimer eingesetzt.

3.2.3 Bestimmung der optimalen Einsatzkonzentration der Primer

Die bakteriellen sowie die DRC-Primer wurden anfänglich jeweils in einer Konzentration von 5 μ M eingesetzt. Während hohe Konzentrationen die Bildung von Primerdimeren und unspezifischen Produkten begünstigen, kann der Einsatz einer zu niedrigen Konzentration die Sensitivität der PCR herabsetzen. Deshalb sollte möglichst genau die Konzentration

ermittelt werden, bei welcher die Primer noch spezifisch binden, die Sensitivität jedoch nicht negativ beeinflusst wird.

3.2.3.1 Bestimmung der optimalen Konzentration der Bakterienprimer

Obwohl für beide qPCR-Ansätze die Primer in der gleichen Konzentration eingesetzt wurden und sich auch die Temperaturprogramme nicht unterschieden, erreichten die detektierten Fluoreszenzwerte der jeweiligen Standardproben, wenn sie mit den universellen Bakterienprimern amplifiziert wurden, den Schwellenwertzyklus eher als die gleichen Standardproben, wenn sie mit den DRC spezifischen Primern amplifiziert wurden (Abb. 14). Um die produzierten Kopienzahlen der beiden Ansätze miteinander vergleichen zu können, ist es jedoch von Vorteil, wenn die generierten Standardkurven nahezu identisch sind. Deshalb wurde der Einfluss verschiedener Konzentrationen 5 µM; 2,5 µM; 1 µM; 0,5 µM und 0,1 µM der universellen Bakterienprimern auf die Amplifizierung einer Standardprobe untersucht. Als *Template*-DNA wurde der Standard mit der Konzentration von 1×10^5 Kopien pro µl eingesetzt und jeweils mit den DRC-Primern in einer Konzentration von 5 µM und den Bakterienprimern der oben genannten Konzentration im Dreifachansatz amplifiziert. Die Amplifikationskurven, welche mit den bakteriellen Primern generiert wurden, verschieben sich zu späteren Zyklen, wenn die Konzentration der eingesetzten Bakterienprimer sinkt (Abb. 15). Es mussten also mehr Amplifikationszyklen durchgeführt werden, bevor ein Signal oberhalb des Schwellenwertes detektiert wurde, als mit einer höheren Primerkonzentration. Bei einer Einsatzkonzentration von 0,1 µM der Bakterienprimer fand keine Amplifizierung mehr statt. Die Amplifikationsgraphen der 1 µM Bakterienprimern und der 5 µM DRC-Primer fielen teilweise zusammen. Die gleiche Anzahl an *Template*-DNA wurde im selben Zyklus detektiert (Abb. 15). Für weiterführende Experimente wurde deshalb eine Primerkonzentration von 1 µM für die universellen Bakterienprimer eingesetzt. Es wurde beobachtet, dass es bei keiner der verwendeten Primerkonzentrationen zur Bildung unspezifischer Produkte kam (Abb. 16).

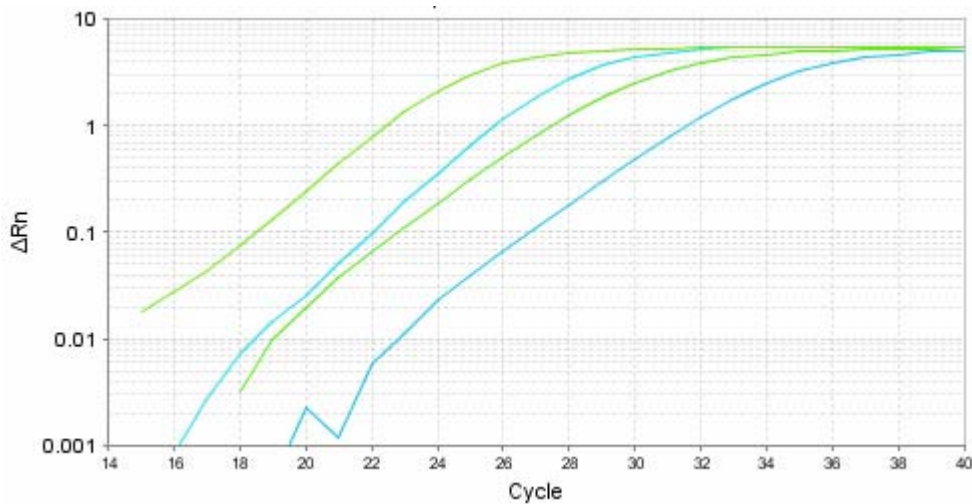


Abb. 14: Amplifikationsgraphen verschiedener Standards (Im Gegensatz zu den in 2.4.2 gezeigten Graphen wurde die y-Achse hier in logarithmischer Form aufgetragen). Die grünen Graphen wurden mit den universellen Bakterienprimern, die blauen mit den DCR Primern generiert. Der jeweilige linke Graph einer Farbe wurde durch die Amplifizierung des 1×10^6 Kopien/ μ l der jeweilige rechte durch die Amplifizierung des 1×10^5 Kopien/ μ l Standards generiert.

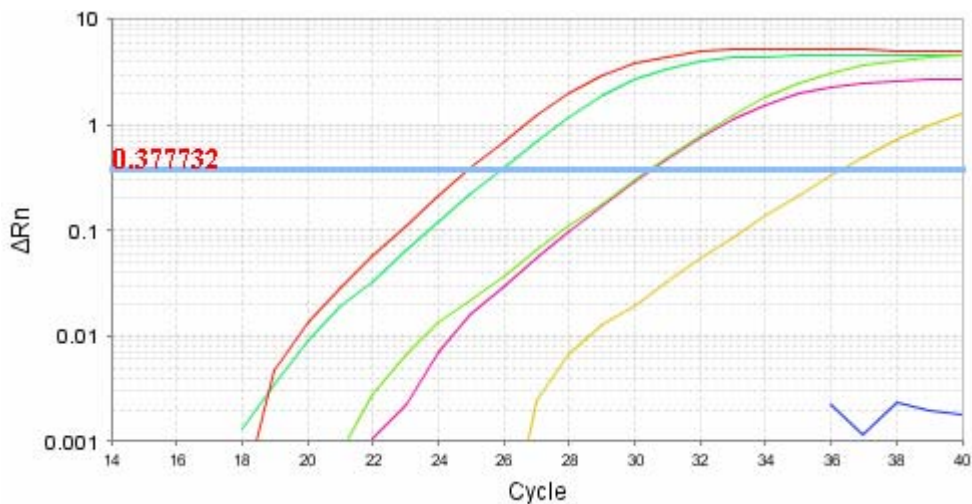


Abb. 15: Amplifikationskurven der verschiedenen Primerpaare und Primerkonzentrationen. Von links nach rechts: Bakterienprimer in der Konzentrationen von (rot: 5 μ M, dunkelgrün: 2,5 μ M, pink: 1 μ M, gelb: 0,5 μ M, dunkelblau: 0,1 μ M). Der hellgrüne Graph wurde mit 5 μ M DCR-Primern generiert. Bei einem Fluoreszenzschwellenwert von 0,377732 (blaue waagerechte Linie) lag der durchschnittliche C_t -Wert einer Doppelbestimmung für die Amplifizierung mit den 5 μ M Bakterienprimern bei 30,8 während der für die Amplifizierung mit den 1 μ M DCR-Primern 30,7 betrug.

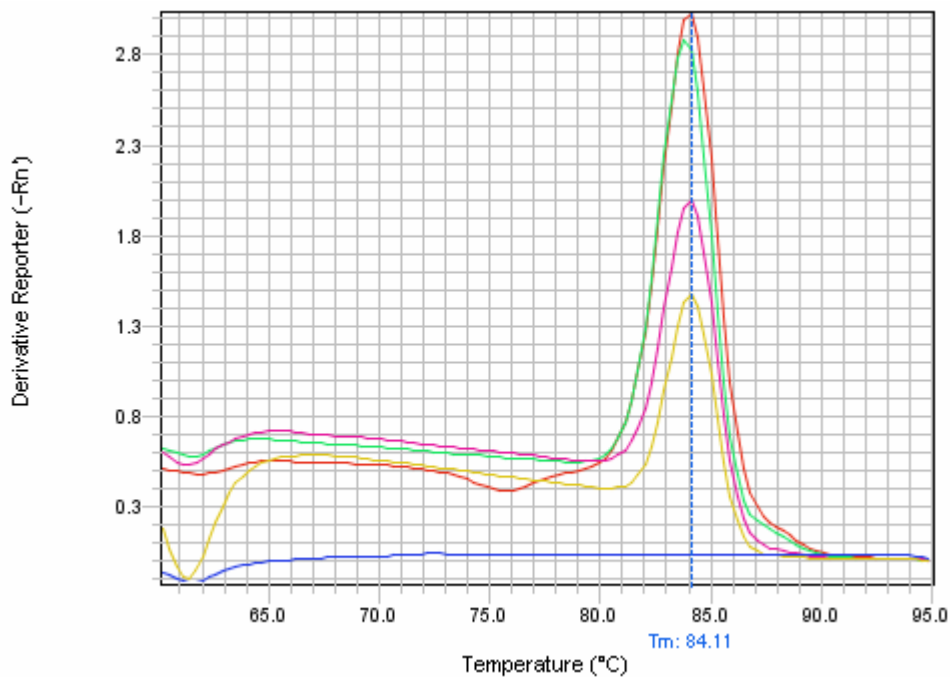


Abb. 16: Schmelzkurven der qPCR-Produkte, welche mit den Bakterienprimern in den Konzentrationen (rot: 5 µM, grün: 2,5 µM, pink: 1 µM, gelb: 0,5 µM, dunkelblau: 0,1 µM) generiert wurden.

3.2.3.2 Bestimmung der optimalen DRC-Primerkonzentration

Auch die Konzentration der DRC-Primer wurde variiert, um deren Einfluss auf die Amplifizierung zu beobachten. Dazu wurden eine Standardreihe von 1×10^6 bis 1×10^2 Kopien je Mikroliter als *Template*-DNA eingesetzt und jeweils mit 5 und 10 µM DRC-Primern amplifiziert. Im Vergleich zu den mit den 5 µM Primern generierten Amplifikationskurven, waren die Graphen für den Einsatz der 10 µM DRC-Primer in Richtung kleinerer Zyklenwerte verschoben (Abb. 17). Anhand der Schmelzkurven für die Standardreihe der 10 µM DRC-Primer war zu erkennen, dass dies auf eine erhöhte Produktion an unspezifischen Produkten zurückzuführen ist (Abb. 18). Die mit den 5 µM DRC-Primer generierten Amplifikationsprodukte der Standardproben wiesen hingegen nur spezifische Schmelzpeaks auf (Abb. 19).

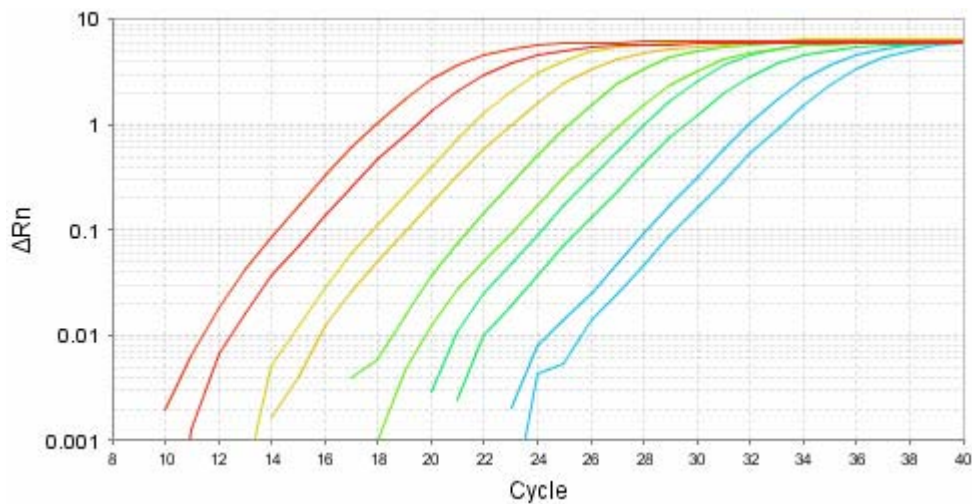


Abb. 17: Amplifikationsgraphen der Standardproben (rot: 1×10^6 , gelb: 1×10^5 , hellgrün: 1×10^4 , dunkelgrün: 1×10^3 , blau: 1×10^2 Kopien/ μ l) generiert mit den 10 μ M (jeweils linker Graph einer Farbe) und 5 μ M DRC-Primern (jeweils rechter Graph einer Farbe).

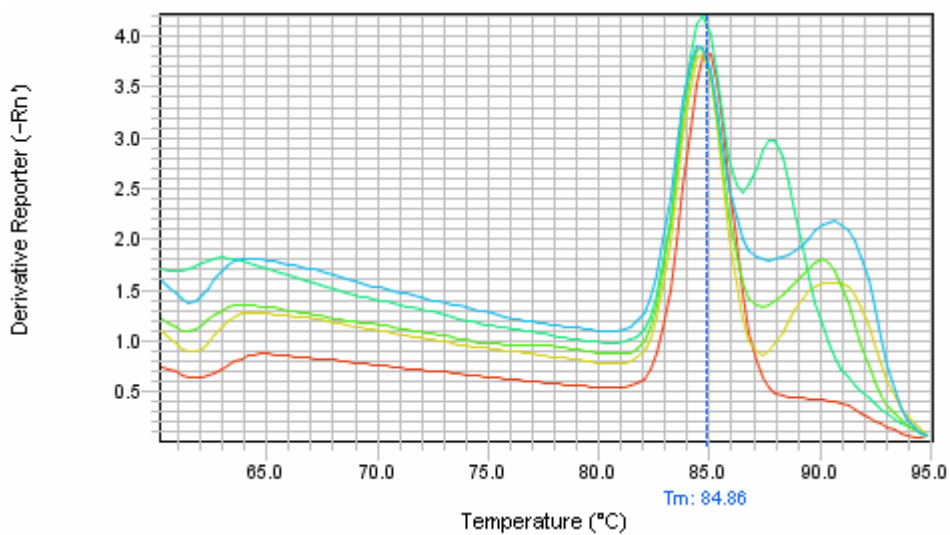


Abb. 18: Schmelzkurven der Standardproben von 1×10^6 bis 1×10^2 Kopien/ μ l amplifiziert mit 10 μ M DRC-Primern. Es handelt sich hier um die gleichen Standardproben wie in **Abb. 17** (rot: 1×10^6 , gelb: 1×10^5 , hellgrün: 1×10^4 , dunkelgrün: 1×10^3 , blau: 1×10^2 Kopien/ μ l).

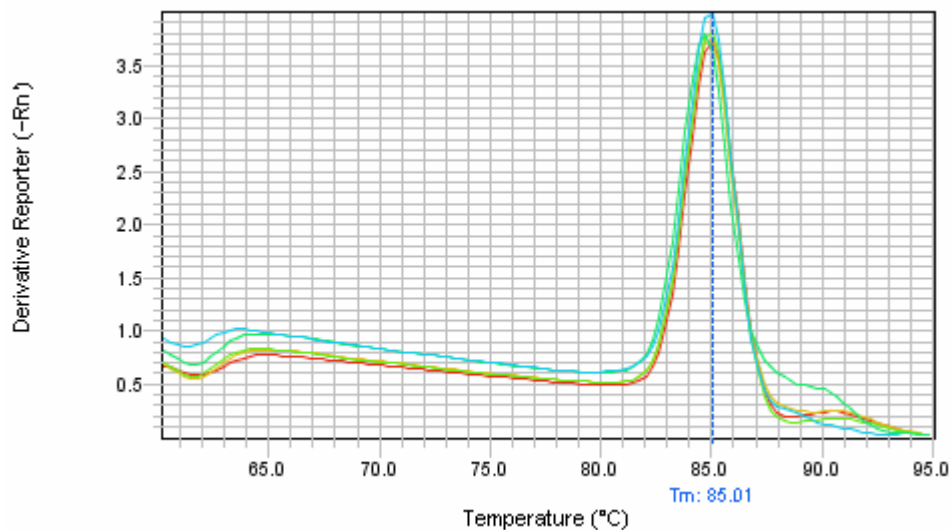


Abb. 19: Schmelzkurven der Standardproben von 1×10^6 bis 1×10^2 Kopien/ μ l amplifiziert mit 5 μ M DRC-Primern. Es handelt sich hier um die gleichen Standardproben wie in **Abb. 17** (rot: 1×10^6 , gelb: 1×10^5 , hellgrün: 1×10^4 , dunkelgrün: 1×10^3 , blau: 1×10^2 Kopien/ μ l).

In einem weiteren Versuch wurde der bakterielle PCR Ansatz mit 1 μ M Primern durchgeführt und jeweils einem DRC-Lauf mit 5 μ M und 1 μ M Primern gegenübergestellt. Als *Template* diente CBDB1-DNA die aus einer Reinkulturen isoliert wurde. Die DNA-Proben mit der Bezeichnung CBDB1 a-c und die Probe CBDB1 d stammen aus zwei verschiedenen Reinkulturen. CBDB1 a-c stellen dabei Triplikate aus einer Kultur dar, welche trotz gleichem Extraktionsverfahren unterschiedliche DNA-Gehalte aufweisen, was die mit dem Photometer gemessenen Werte vermuten ließen (Tab. 20) und mittels qPCR bestätigt wurde (Tab. 21). Die *Template*-DNA wurde jeweils in den Verdünnungen 1:10 und 1:100 im Doppelansatz eingesetzt. Wenn Kontaminationen weitestgehend ausgeschlossen werden können, sollten die ermittelten Kopienzahlen für die Bakterienwerte mit denen für die DRC übereinstimmen. Die Amplifikation der DRC-DNA mit den 5 μ M Primern verläuft in den 1:10 Verdünnungen schlechter als in den 1:100 Verdünnungen. Bei der Amplifizierung mit den 1 μ M DRC-Primern konnten vor allem kleine Konzentrationen an Ausgangs-DNA (in den 1:100 verdünnten Proben) nicht ausreichend amplifiziert werden. Alle Kopienzahlen unter 1000 Kopien pro Reaktionsansatz wurden generell nicht detektiert (Tab. 21). Die Standardkurve zur Bestimmung der DRC-Kopienzahl konnte deshalb nur über 4 Standards im Bereich von 1×10^6 bis 1×10^3 Kopien/ μ l generiert werden, was zu einer Effizienz von lediglich 63% führte. Es lässt sich schließlich schlussfolgern, dass bei der Anwendung der 5 μ M DRC-Primer die PCR-Amplifizierung vorteilhafter verläuft als mit den 1 μ M DRC-Primern.

Tab. 21: Übersicht der Kopienzahlen für den Einsatz von 5 µM und 1 µM DRC-Primern

Template- DNA [Verdünnung]	1 µM Bakterienprimer	5 µM DRC-Primer		1 µM DRC-Primer	
	MW [Kopien/µl]	MW [Kopien/µl]	DRC-Anteil	MW [Kopien/µl]	DRC-Anteil
CBDB1 a [1:10]	4,26E+03	3,38E+03	79 %	4,21E+03	99 %
CBDB1 a [1:100]	4,09E+02	3,47E+02	85 %	-	-
CBDB1 b [1:10]	5,96E+03	4,41E+03	74 %	7,64E+03	128 %
CBDB1 b [1:100]	4,77E+02	4,84E+02	101 %	-	-
CBDB1 c [1:10]	2,23E+04	1,11E+04	50 %	1,06E+04	48 %
CBDB1 c [1:100]	1,07E+03	1,01E+03	94 %	1,20E+03	112 %
CBDB1 d [1:10]	5,02E+03	5,12E+03	102 %	6,02E+03	120 %
CBDB1 d [1:100]	3,85E+02	4,08E+02	106 %	-	-

Es sind die jeweiligen Mittelwerte der mit den Bakterien- und DRC-Primern (in der Einsatzkonzentration von 1 µM und 5 µM) ermittelten DNA-Kopienzahlen dargestellt. Die zweite Teilspalte der 3. und 4. Spalte verdeutlichen den jeweiligen relativen Anteil der DRC-Kopien zu den Gesamtbakterienkopien. Er sollte im Idealfall 100 % betragen.

3.2.4 Ermittlung der optimalen Zusammensetzung des Reaktionsansatzes

Um zu untersuchen ob der Einsatz der doppelten Menge an *Template*-DNA den hohen Schwankungen bei der Detektion der Kopienzahlen entgegen wirkt, wurde die Zusammensetzung des 20 µl Reaktionsansatzes geändert (Tab. 22). Die mit dieser neuen Reaktionsansatzzusammensetzung ermittelten Kopienzahlen wurden denen, welche mit der ursprünglichen Zusammensetzung (7 µl PCR-H₂O, 10 µl 2xSensiMix, 1µl *forward*-Primer, 1 µl *reverse*-Primer und 1 µl *Template*-DNA) erzielt wurden, gegenübergestellt. Es wurden jeweils vier verschiedene CBDB1-DNA-Proben in einer 1:10 und 1:100 Verdünnung als *Template* eingesetzt. Die Effizienzen beider Ansätze lagen im akzeptablen Bereich (1 µl *Template*-DNA: 88% Effizienz; 2 µl *Template*-DNA: 94 % Effizienz). Daraus kann geschlossen werden, dass die Amplifizierung der Standards sowohl beim Einsatz von 1 µl als auch 2 µl der Standardproben gleichermaßen gut verläuft.

Beim Einsatz von 1 µl *Template*-DNA, konnte die DNA-Kopienzahl sowohl in den 1:10 als auch in den 1:100 Verdünnungen während eines qPCR-Laufes ungehindert detektiert werden. Bei einem qPCR-Lauf mit 2 µl *Template*-DNA wurde vor allem die Amplifizierung der stark verdünnten CBDB1-DNA-Proben gehemmt. Wenn sich das Verhältnis an

eingesetztem *Template*-Volumen zum Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes vergrößert, nimmt die Sensitivität des DRC-qPCR-Ansatzes ab (Tab. 23). Dies ist auf die Verschiebung des Reaktionsansatzgehaltes zu höheren Volumina an extrahierter DNA, und somit einem erhöhten Anteil an Inhibitoren zurückzuführen. Auf Grund dieses Sensitivitätsnachlasses beim Einsatz von 2 µl *Template*-DNA wurde in weiteren Experimenten stets nur 1 µl *Template*-DNA eingesetzt.

Tab. 22: neue Zusammensetzung des 20 µl Reaktionsansatzes

Komponente	Volumen
PCR - H ₂ O	6 µl
2 x SensiMix	10 µl
<i>forward</i> - Primer	1 µl
<i>reverse</i> - Primer	1 µl
<i>Template</i> - DNA	2 µl

Tab. 23: DRC-Kopienzahl der Reaktionsansätze mit 1 µl (ursprünglich) und 2 µl *Template*-DNA

<i>Template</i> - DNA [Verdünnung]	MW DRC [Kopien/µl]	
	1 µl <i>Template</i>	2 µl <i>Template</i>
CBDB1 a [1:10]	1845	272
CBDB1 a [1:100]	130	-
CBDB1 b [1:10]	2825	2143
CBDB1 b [1:100]	277	-
CBDB1 c [1:10]	6145	5920
CBDB1 c [1:100]	443	481
CBDB1 d [1:10]	1715	1675
CBDB1 d [1:100]	170	-

3.2.5 Ermittlung der optimalen durchzuführenden Zyklenzahl

Um den Einfluss der Zyklenzahl auf die Schmelzkurven amplifizierter qPCR-Produkte zu überprüfen, wurde die Zyklenzahl in verschiedenen qPCR-Läufen, mit CBDB1-DNA als *Template*, von 42 Zyklen um jeweils zwei Zyklen bis auf 36 Zyklen herabgesetzt. Es stellte sich heraus, dass die Schmelzkurven mit abnehmender Zyklenzahl weniger unspezifische Produkte, wie Primerdimere und Doppelpeaks aufwiesen (Abb. 20 bis Abb. 23). Weil sich gezeigt hatte, dass bei einer Zyklenzahl von 36 nur ein einziger klarer Peak pro Probe entstand, wurden in nachfolgenden Experimenten stets nur 36 Zyklen durchgeführt. Da

die Quantifizierung der Bakterien- sowie der DRC-Kopienzahlen bereits in den früheren Zyklen abgeschlossen war, wird sie von dem Herabsetzen der Zyklenzahl nicht weiter beeinflusst. Allerdings ist es nun möglich, Aussagen über die Spezifität der generierten Produkte anhand dieser generierten Schmelzkurven für reine CBDB1-DNA zu treffen. Die erhaltenen Schmelzkurven der generierten Produkte aus den Sedimentextrakten haben sich mit dem Herabsetzen der Zyklenzahl ebenfalls verbessert, dennoch weisen sie nicht immer einen deutlichen Peak auf und besitzen untypische Formen, wie Plateaus oder langgezogene Peaks (Abb. 27 bis Abb. 42).

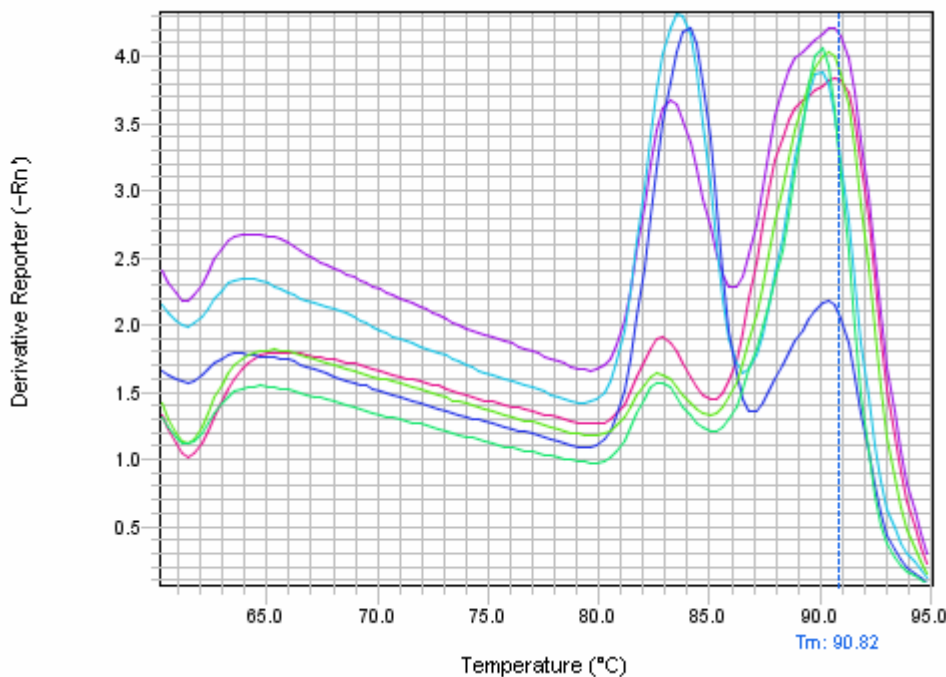


Abb. 20: Schmelzkurven von verschiedenen CBDB1-Kontrollen in unterschiedlicher Verdünnung aufgenommen nach 42 PCR Zyklen (grün: CBDB1b-DNA (1:100), blau: CBDB1c-DNA (1:10), lila/pink: CBDB1c-DNA (1:100))

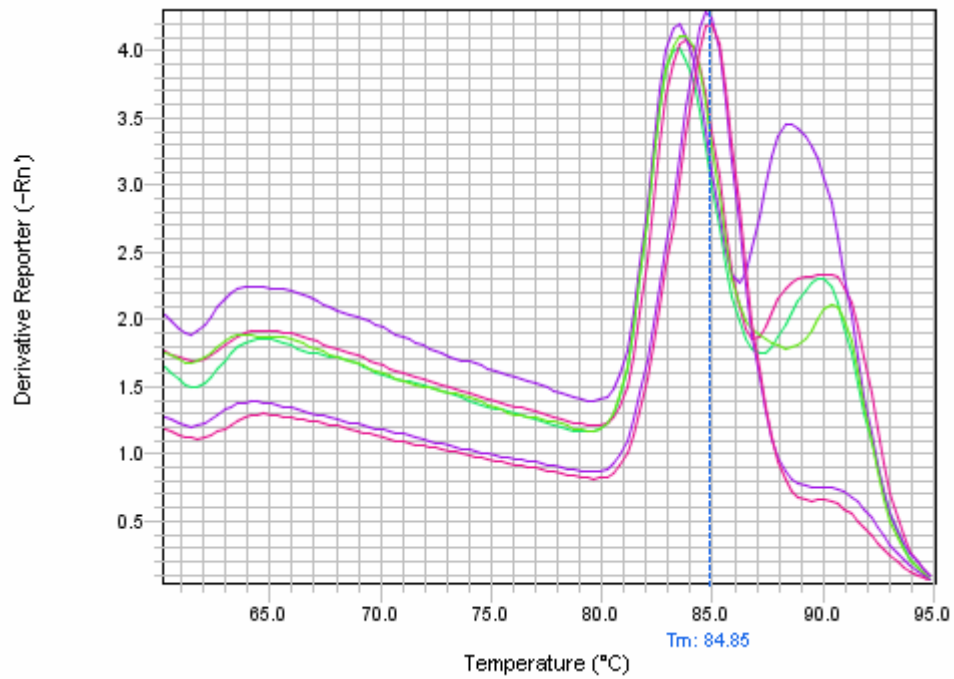


Abb. 21: Schmelzkurven von verschiedenen CBDB1-Kontrollen aufgenommen nach 40 PCR Zyklen (grün: CBDB1a-DNA (1:100), lila/pink (mit Doppelpeak): CBDB1b-DNA (1:100), lila/pink (ein klarer Peak) CBDB1-DNA (1:100))

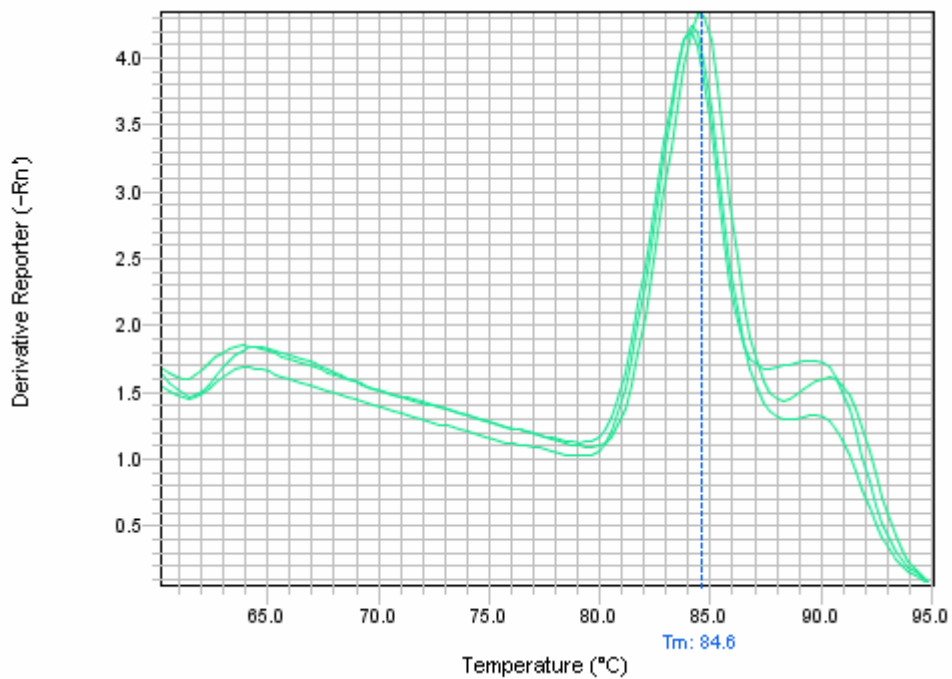


Abb. 22: Schmelzkurven von CBDB1-Kontrollen (1:100) im Dreifachansatz aufgenommen nach 38 PCR Zyklen.

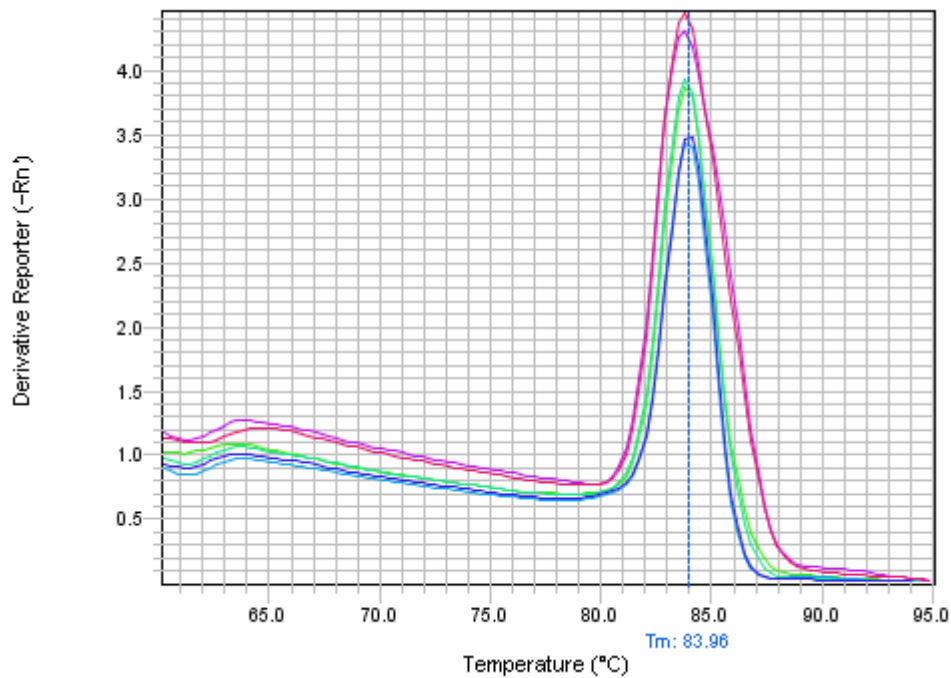


Abb. 23: Schmelzkurven von verschiedenen CBDB1-Kontrollen aufgenommen nach 36 PCR Zyklen (grün: CBDB1c-DNA (1:100), blau: CBDB1b-DNA (1:100), lila/pink: CBDB1-DNA (1:100)).

3.2.6 Ermittlung der optimalen Verdünnungen der aus marinen Sedimenten extrahierten DNA

Es wurden Triplikate einer Aarhus-Sedimentextraktion (Aarhus a-c) jeweils in den Verdünnungen 1:10 und 1:100 mit den universellen Bakterienprimern sowie den DRC-Primern amplifiziert. Die Amplifizierung mit Hilfe der Bakterienprimer verläuft in allen Proben ungehindert, denn in einer zehnfach stärkeren Verdünnung wurden rund zehnmal weniger Kopien je Mikroliter detektiert. Betrachtet man hingegen die erzielten DNA-Kopiegehalte für den DRC-Ansatz, fällt auf, dass in den stärkeren Verdünnungen plötzlich höhere Kopienzahlen erreicht wurden (Tab. 24). Um die Vermutung zu bestätigen, dass die Amplifizierung mittels der DRC-Primer in den schwächer verdünnten Proben behindert wird, wurde ein weiterer qPCR-Lauf mit verschiedenen verdünnter CBDB1-DNA durchgeführt. Die Amplifizierung mit den Bakterienprimern lief in den ersten drei Proben normal ab. In der 1:1000 Verdünnung wurden plötzlich mehr Kopien detektiert als eigentlich vorhanden waren. Die DRC-Primer vervielfältigten alle DNA-Kopien in den Verdünnungen. In der unverdünnten Probe wurden hingegen nicht alle DNA-Kopien nachgewiesen (Tab. 25).

Tab. 24: DNA Kopienzahl in den Aarhus-Sedimentextrakten für den Bakterien-und DRC-Ansatz

Template- DNA [Verdünnung]	MW Bakterien [Kopien/μl]	MW DRC [Kopien/μl]
Aarhus a [1:10]	1,1E+07	1,0E+04
Aarhus a [1:100]	8,4E+05	5,0E+04
Aarhus b [1:10]	1,0E+07	5,6E+02
Aarhus b [1:100]	8,7E+05	5,2E+03
Aarhus c [1:10]	1,1E+07	9,1E+02
Aarhus c [1:100]	7,9E+05	1,1E+04

Tab. 25: DNA-Kopienzahl in den CBDB1-DNA-Extrakten für den Bakterien-und DRC-Ansatz

Template- DNA [Verdünnung]	MW Bakterien [Kopien/μl]	MW DRC [Kopien/μl]	Anteil an DRC
CBDB1 [1:1]	2,1E+05	1,2E+05	56 %
CBDB1 [1:10]	2,1E+04	2,3E+04	109 %
CBDB1 [1:100]	2,7E+03	2,9E+03	106 %
CBDB1 [1:1000]	6,7E+02	2,2E+02	32 %

3.2.7 Verhältnis von DRC zur Gesamtbakterienzahl in verschiedenen Sedimenten

Experiment 1:

Nach der erfolgreichen Etablierung der Methode wurden verschiedene Sedimentextrakte auf das Vorhandensein von DRC untersucht. Dazu wurden für dieses Experiment drei CBDB1-DNA-Positivkontrollen unterschiedlicher DNA-Konzentration (CBDB1 a - c) mitgeführt.

Die untersuchten Sedimentextrakte wiesen unterschiedliche Beträge an Bakterien-DNA-Kopien auf. Am stärksten sind die Sedimente aus Chile, Neapel und der Nordsee mit Bakterien besiedelt. Die Bakterienzahlen in den verschiedenen Nordseeproben schwanken untereinander. In den Irlandproben wurden zwar kaum Bakterien-DNA-Kopien nachgewiesen, dafür enthalten diese Sedimente gemeinsam mit der Nordsee 8-Probe den größten Anteil an DRC zur Gesamtbakterienzahl (Abb. 24). Das Nordsee 7-Sedimentextrakt, weist ebenso einen beträchtlichen Anteil an DRC auf, während die restlichen Proben kaum DRC enthalten. Der absolut höchste Gehalt and DRC befindet sich im Nordsee 18-Sediment (Tab. 26). Dieses Sediment stammt aus 15 cm Tiefe. Bei

Betrachtung der Werte für die CBDB1-Kontroll-DNA fällt auf, dass der errechnete Prozentsatz an DRC, je nach Kopienzahl schwankt. Je mehr Gesamtbakterienkopien für die CBDB1-Kontroll-DNA in dem qPCR-Lauf detektiert wurden, desto höher lag der Wert der ermittelten DRC-Kopienzahl. (Tab. 26).

Tab. 26: Kopienzahlen der Bakterien und DRC-DNA in Sedimentextrakten

<i>Template</i> -DNA	MW Bakterien [Kopien/ μ l]	MW DRC [Kopien/ μ l]	Anteil an DRC
Nordsee 7	4,15E+04	3,69E+03	9%
Nordsee 8	1,60E+04	3,38E+03	21%
Nordsee 9	1,16E+05	3,51E+03	3%
Nordsee 13	8,81E+04	5,45E+02	1%
Nordsee 15	2,05E+05	1,72E+03	1%
Nordsee 18	2,65E+05	5,92E+03	2%
Neapel	2,48E+04	1,10E+02	0,4%
Chile oben	3,12E+05	9,73E+02	0,3%
Chile unten	4,72E+05	3,46E+03	1%
Irland 17	1,21E+02	2,19E+01	18%
Irland 18	2,49E+02	4,16E+01	17%
CBDB1 a	8,12E+02	7,18E+02	88%
CBDB1 b	1,72E+03	1,66E+03	97%
CBDB1 c	5,78E+04	6,48E+04	112%

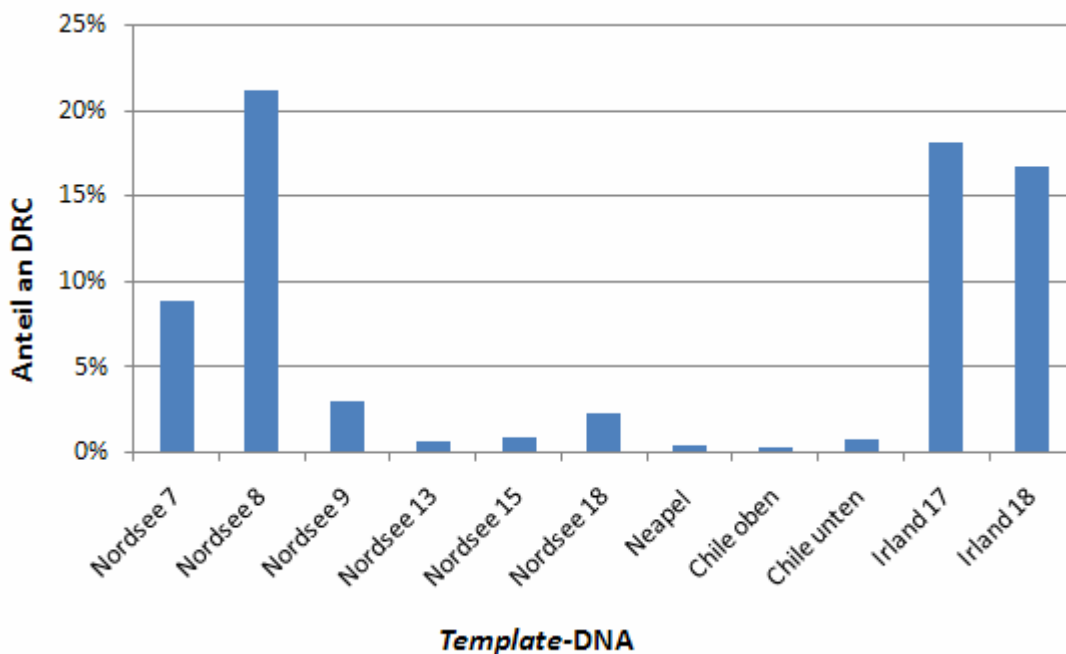


Abb. 24: prozentualer Anteil an DRC zur Gesamtbakterienzahl in Sedimenten

Experiment 2:

Bei der mehrfachen Extraktion desselben Sedimentes können die DNA-Ausbeuten stark schwanken (Tab. 20). Um den Einfluss dieser Variationen auf den Verlauf der qPCR abschätzen zu können, wurde die DNA von Sedimenten aus Peru, Sumatra und vom schwarzen Meer im Doppelansatz extrahiert (Set 1 und Set 2). Die Duplikate wurden darauf in zwei getrennten qPCR-Läufen jeweils mittels der universellen Bakterien- und DRC-Primer vervielfältigt.

Tab. 27: relativer Anteil an DRC zur Gesamtbakterienzahl zweier Extraktionssets

<i>Template- DNA</i>	Anteil an DRC (Set 1)	Anteil an DRC (Set 2)	MW Anteil an DRC
Peru 1	14%	20%	17%
Peru 6	7%	18%	12%
Sumatra 1	0,2%	0,3%	0,3%
Sumatra 2	1%	1%	1%
Sumatra 3	1%	2%	2%
Sumatra 4	1%	1%	1%
Sumatra 5	2%	3%	2%
Schwarzes Meer 1	2%	2%	2%
Schwarzes Meer 2	0,1%	0,1%	0,1%
Schwarzes Meer 3	2%	2%	2%
CBDB1 DNA	67%	74%	71%

Dargestellt sind die Prozentzahlen des relativen Anteils an DRC zur Gesamtbakterienzahl von Set 1 und Set 2 und der aus diesen errechnete Mittelwert (MW).

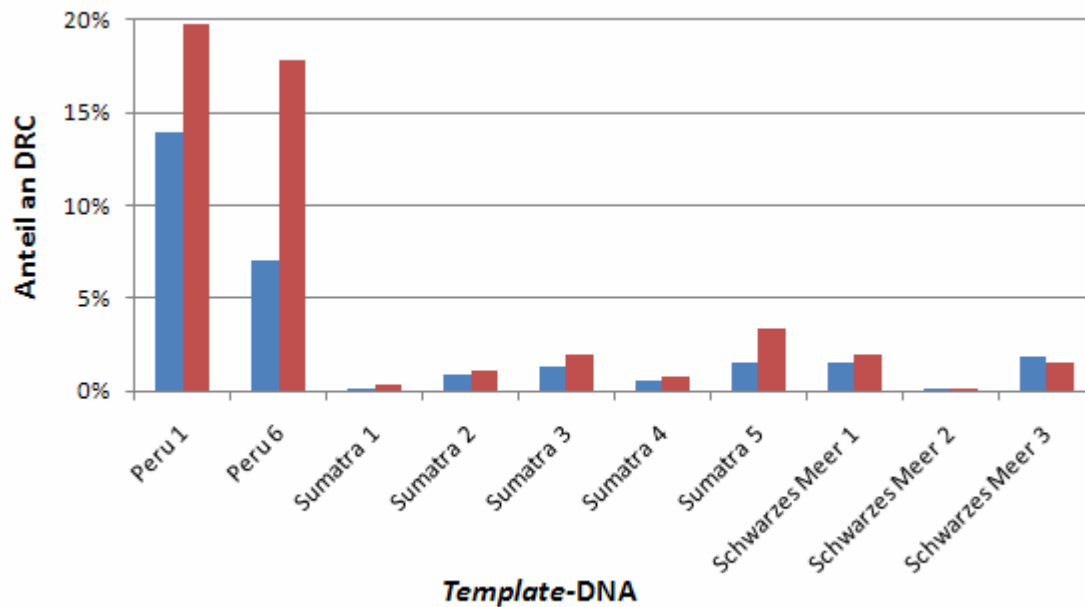


Abb. 25: relativer Anteil an DRC zur Gesamtbakterienzahl in Sedimenten. Die blauen Balken verdeutlichen den Anteil an DRC von Set 1, die roten Balken hingegen den Anteil an DRC von Set 2.

3.2.8 Betrachtung der Amplifikationseffizienzen und Schmelzkurven

Um Dopplungen zu vermeiden werden hier nur die Resultate des Experimentes 1 dargestellt. Der Sachverhalt bezieht sich jedoch auf jeden qPCR-Lauf.

Im Idealfall sollten aufgrund der exponentiellen Natur der Amplifizierungsreaktion, die Anzahl der Amplifikate pro Zyklus verdoppelt werden. Das führt dazu, dass immer genau 3,32 Zyklen vergehen bis sich die Menge an DNA-Kopien in einem Reaktionsansatz verzehnfacht hat. Ist dies der Fall erhält man eine Amplifikationseffizienz der Primer von 100%. Bei Betrachtung der erzeugten Amplifikationsgraphen und der C_T -Werte für die Standardproben fällt auf, dass von einem Standard zum nächsten nicht immer exakt 3,32 Zyklen vergehen (Tab. 28).

Tab. 28: Differenz der C_t-Werte zwischen zwei amplifizierten Standardproben aus Experiment 1

Betrachtete Standards [Kopien/μl]	Differenz der Ct-Werte	
	DRC-Primer	Bakterienprimer
10 ² bis 10 ³	4,3	3,8
10 ³ bis 10 ⁴	3,0	2,6
10 ⁴ bis 10 ⁵	4,8	4,8
10 ⁵ bis 10 ⁶	3,3	3,6
10 ⁶ bis 10 ⁷	-	3,4

Differenz der C_t-Werte zwischen zwei jeweils aufeinander folgenden 1:10 verdünnten Standardproben. Die dargestellten C_t-Werte sind repräsentativ für den Mittelwert aus der Vervielfältigung zweier paralleler Standardproben mit den DRC- und Bakterienprimern.

Während der Durchführung mehrerer qPCR-Experimente lagen die Effizienzen der DRC-Primer in der Regel unter 90% und fielen meist deutlich geringer aus, als für die Bakterienprimer. Bei Betrachtung der Schmelzkurven der unterschiedlichen Sedimentextrakte sowohl für den DRC- als auch den Bakterienansatz fällt auf, dass diese Schmelzkurven stark von der Idealform, wie sie bei den jeweiligen Standards und CBDB1-Kontrollen auftreten, abweichen (Alle Abbildungen siehe Anhang 2).

4 Diskussion

4.1 Einschätzung der Anwendbarkeit des modifizierten fluoreszenzmikroskopischen Zählverfahren zur Zellkonzentrationsbestimmung in Reinkulturen

Der lineare Korrelationskoeffizient von 0.98 der Untersuchungen der Zellkonzentrationen verschiedener Verdünnungsstufen eines CBDB1-Kulturkonzentrates (Abb. 10) lässt darauf schließen, dass ein linearer Zusammenhang zwischen der tatsächlichen Zellkonzentration einer Probe und der ermittelten Zellzahl besteht. Mit Hilfe der fluoreszenzmikroskopischen Zählung können folglich Zellkonzentrationen von CBDB1-Reinkulturen in etwa 20 Minuten mit geringem Arbeitsaufwand quantifiziert werden. Die Methode der Fluoreszenzmikroskopie ist trotz bereits durchgeführter Optimierungsschritte noch stark fehleranfällig, was die mittlere Standardabweichung von 27,3% bestätigt. Um den praktischen Versuchsaufwand zu begrenzen, wurden in dieser Arbeit jeweils nur zehn Bilder pro Probe und drei Proben pro zu zählender Kultur untersucht. Durch die Erhöhung der Anzahl der mikroskopischen Aufnahmen würde sich statistisch gesehen die Standardabweichung automatisch etwas verbessern. Die Extrapolation der Zellzahlen des analysierten Volumens von ca. 0,0011 μl , was dem Volumen an Zellkultur einer mikroskopischen Aufnahme entspricht, auf 1 ml kann ebenfalls zu Über- oder Unterschätzungen der Zellzahl führen. Eine weitere Vergrößerung des Sichtfeldes könnte hier Abhilfe schaffen. Manchmal kommt es auch vor, dass Zellen trotz ihrer passenden Größe zwischen 30 und 400 Pixel und Helligkeit (65 cd/m^2) von der Auswertesoftware eliminiert werden. Da dies zu einer Unterschätzung der eigentlichen Zellkonzentration führen würde, wurden die ausgewerteten Bilder nacheinander eingehend betrachtet und die Zählwerte bei Eintritt dieses Falles, manuell angepasst. Das System wird jedoch auch von einer Reihe weiterer Faktoren beeinflusst, dessen Eliminierung sich etwas schwieriger gestaltet. In einigen Fällen wurden Zellanhäufungen im Mikroskop beobachtet (Abb. 26), welche auf eine inhomogene Agaroseschicht zurückgeführt werden können. Trotz entsprechender vorgenommener Optimierung bei der Aufbringung und der Trocknung der Agaroseschicht lässt sich das Auftreten inhomogener Bereiche nicht komplett vermeiden. Leichte Senken oder Erhebungen in der Agaroseschicht können zu einer Ansammlung der Zellen führen und stellen somit potentielle Fehlerherde dar. Um den Einfluss dieser Fehlerherde auf das Ergebnis der Zählung zu minimieren, wurden solche Gebiete bei der Aufnahme von mikroskopischen Bildern weiträumig ausgespart. Der Konzentrationsbereich in dem eine Quantifizierung möglich ist, wird durch eine

Detektionsgrenze von minimal $9,3 \times 10^5$ Zellen pro ml beschränkt. Zu hohe Konzentrationen führen dazu, dass die Zellen unter dem Mikroskop als nicht mehr voneinander getrennt wahrzunehmen sind. Dies wurde in etwa bei Konzentrationen höher 1×10^9 Zellen je Milliliter beobachtet. Für höhere Zellkonzentrationen muss die Kultur entweder vor der Zählung verdünnt werden oder man setzt ein STED-Mikroskop ein, welches dazu in der Lage ist, das Abbe Limit der Auflösung zu umgehen. Durch den Effekt der Photobleichung kam es vor, dass einige Zellen zum Zeitpunkt der Bildaufnahme nur noch ein sehr schwaches Signal lieferten. Um dies zu umgehen, sollte die Bildaufnahme relativ zügig durchgeführt werden. Es wurde gezeigt, dass hohe Salzkonzentrationen im Kulturmedium, wie sie in den Konzentraten der Vakuumdestillation auftreten, den Effekt der Photobleichung zusätzlich verstärken. Daraus resultiert, dass nicht alle Medien auf gleiche Weise für diese Art der Zellquantifizierung geeignet sind. Der Einsatz von Antibleichagentien wie z.B. VECTASHIELD® (Vector Laboratories Inc.) und Citifluor Ltd. (Davidson, R Stephen) könnten diesem Effekt entgegen wirken. Die Anwendung dieser Antibleichagentien wurde in dieser Arbeit jedoch nicht weiter untersucht. Zellen, deren DNA trotz der intensiven Färbeprozedur nicht angefärbt wurden, können mit dieser Methode ebenfalls nicht erfasst werden.

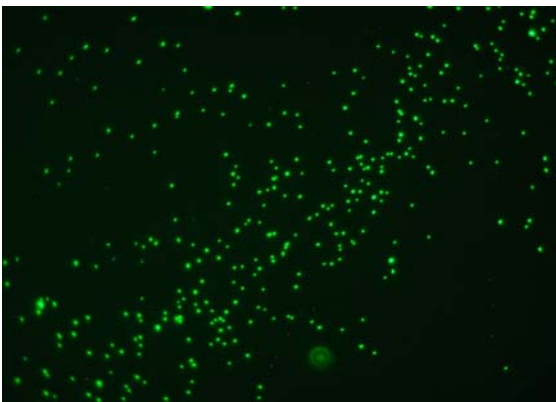


Abb. 26: Mikroskopisches Bild beobachteter Zellanhäufungen

4.2 Abschätzung der Eignung der angewendeten Trennverfahren zur Aufkonzentrierung und Ernte von CBDB1-Zellen aus Reinkulturen

Es wurde das Potential zur Aufkonzentrierung der CBDB1-Zellen mittels unterschiedlicher Verfahren untersucht, welche jeweils spezielle Vor- und Nachteile aufweisen. Prinzipiell ist mit allen angewandten Verfahren eine Aufkonzentrierung der Zellen möglich. Die Qualität des gewonnenen Zellkonzentrates sowie die erzielten Zellausbeuten und Anreicherungs-faktoren variieren jedoch stark von Methode zu Methode. Die Zentrifugation stellt ein sehr komplexes Verfahren dar, bei dem die Zellabtrennung von einer Vielzahl an Faktoren abhängig ist, welche das Resultat stark beeinflussen und die miteinander wechselwirken. Bei diesen Faktoren handelt es sich um die Zentrifugationszeit, -temperatur, die Partikelgröße und -form der in der Suspension enthaltenen Teilchen, die Viskosität der Probe und den Anteil an Feststoffen in der Flüssigkeit. Mit Hilfe der Zentrifugation ist es unmöglich eine vollständige Feststoffabtrennung zu erzielen. Als nachteilig erwies sich ebenfalls, dass sich neben den Zellen auch eventuell entstandene Niederschläge aufkonzentrieren. Für bestimmte Anwendungen, wie z.B. die Weiterverwendung des Zellkonzentrates zur DNA-Extraktion kann sich diese Niederschlagsanhäufung als hinderlich erweisen. Die im Dreifachansatz bestimmten Zellausbeuten eines durchgeführten Zentrifugationsexperimentes schwankten zwischen 69 % und 105 % (Tab. 12). Diese Schwankungen könnten darauf zurückzuführen sein, dass die Reproduzierbarkeit der analytischen Resultate stark von Art der Abnahme des Überstandes abhängt. Da die Überstandsabnahme manuell erfolgt, ist sie leicht anfällig für Verfälschungen. Je nach Eintauchtiefe und -geschwindigkeit der Pipette in die Zellsuspension wird das entstandene Pellet unterschiedlich stark beeinflusst. Bei Untersuchungen eines Protokolls zur Anreicherung der Zellen, welches mehrere Zentrifugationsschritte beinhaltete, wurde herausgefunden, dass sich die Zellen mit Hilfe dieser angewendeten Zentrifugationsprozedur um das etwa 30-fache (je nach angestrebten Endvolumen noch stärker) aufkonzentrieren lassen (Vergleich Tab. 13 und Tab. 14). Dabei wurden jedoch Zellverluste bis zu über 70 % verzeichnet. Es ist anzunehmen, dass die Zellen bei der Abnahme des Überstandes mit verworfen wurden. Entweder haben sie sich nach dem ersten Zentrifugationsschritt nicht ausreichend abgesetzt oder bei der Entfernung des Überstandes, wurde das Pellet durch die bei der Abnahme entstehende Bewegung wieder mit dem Überstand vermischt und fälschlicherweise mit verworfen. Ungeklärt scheint dabei die Tatsache, dass im jeweiligen zweiten erzeugten Pellet weniger Zellverluste (ca. 1 % bis kein Verlust) zu verzeichnen

war, obwohl sich die Menge und Art der Abnahme des Überstandes nach der zweiten Zentrifugation nur unbeträchtlich von der zum Erhalt des ersten Pellet unterscheidet. Es ist anzunehmen, dass sich die Zellen trotz erfolgter Resuspension, noch in Agglomerat-ähnlicher Form zusammengelagert in der Zellsuspension befinden. Es ist weiterhin anzunehmen, dass sich die Zellen bei der zweiten Zentrifugation noch fester zusammenlagern und bei der abermaligen Abnahme des Überstandes durch die Bewegungen der Pipette nicht so leicht in der Suspension lösen, wie das eventuell bei der Abnahme des Überstandes vom ersten erzeugten Pellet der Fall war. Um dieses Problem zu unterbinden, könnte die Dauer des ersten Zentrifugationsschrittes erhöht werden oder das abzunehmende Überstandsvolumen reduziert werden. Der hohe Zeitaufwand von 1 h stellt ebenfalls ein zu beachtendes Kriterium bei der Auswahl der Aufkonzentrierungsmethode dar.

Im Vergleich zur Zentrifugation stellt die Filtration eine weniger zeitaufwendige Methode dar. Alle in der Zellsuspension gelösten Stoffe passieren die Filtermembran und können mit dem Permeat eliminiert werden. Falls jedoch Kulturen mit starkem Niederschlag gefiltert werden, so setzt sich die Membran durch Bildung eines Filterkuchens rasch zu. In diesem Fall ist es ratsam, die Zellsuspension mit einem Filter größerer Porenweite vorzureinigen. Die Untersuchungen der kommerziell verfügbaren Spritzenvorsatzfilter unterschiedlicher Porengröße zeigen, dass die PES 0,1, PES 0,2 sowie CA 0,2 zur vollständigen Abtrennung der CBDB1-Zellen am besten geeignet sind, da in deren Permeaten nachweislich keine Zellen gefunden wurden und sie die größten Zellausbeuten aufwiesen. Die erreichte Zellausbeute der PES 0,1 Filtern ist höher als die erreichte Zellausbeute der Filtermembranen mit einer Porengröße von 0,2 μm , aber der PES 0,1 Filter setzt sich aufgrund seines kleineren Membrandurchmessers schneller zu. Mit steigender Porengröße sinkt das Rückhaltevermögen der CBDB1-Zellen. Die Tatsache, dass ein Teil der CBDB1-Zellen weder in dem zurückgespülten Retentat noch im Permeat nachzuweisen war, lässt vermuten, dass die Zellen sich entweder durch Adsorption an die Membran oder das Gehäusematerial angelagert haben oder aber durch den sich aufbauenden Filterdruck geplatzt sind. Die Filtermethode bietet den Vorteil, dass die Zellen zusätzlich nach der Filtration auf der Membran gewaschen werden können. Die Zellen können somit gründlicher und schneller von unerwünschten kleineren Medienbestandteilen befreit werden.

Für große Volumina und hohe Durchsatzraten, ist die Filtration jedoch nicht so gut geeignet wie die Zentrifugation, da sie die wesentlich preisintensivere Methode darstellt.

Ist es notwendig die CBDB1-Zellen aus großen Volumina anzureichern, eignet sich besonders die in dieser Arbeit angewandte Methode der Vakuumdestillation. Hinsichtlich der erzielten Anreicherungsfaktoren ist die Filtration mittels CA 0,2 Filter effizienter, was Tab. 19 verdeutlicht. Während die Aktivität der Zellen mittels Durchführung der Filtration in einem Anaerobzelt erhalten werden kann, bedarf es für die Vakuumdestillation und Zentrifugation eines höheren Aufwandes, weil der Kontakt der Zellsuspension mit dem Sauerstoff der Luft beim An- und Abmontieren des Kolbens sowie dem Einbringen und Herausnehmen des Falcongefäßes nur schwer zu vermeiden ist. Beim Einsatz der Vakuumdestillation wurden Zellverluste von etwa 70% beobachtet. Es wird vermutet, dass sich die CBDB1-Zellen während des Verdampfungsprozesses an die Glasoberfläche des Kolbens anhaften. Es könnte jedoch auch möglich sein, dass die Zellen durch die Druckschwankungen zerstört werden oder zusammen mit den Salzen ausfallen und deshalb bei der Mikroskopie der Zellsuspension nicht mit erfasst wurden. Die Anhäufung der Salze und Farbstoffe (siehe Abb. 12), welche auf Grund ihres hohen Dampfdruckes nicht evaporieren, könnte ebenfalls eine eventuelle Erklärung für die schlechte Anfärbung der Zellen und das starke Hintergrundleuchten bei der Betrachtung unter dem Fluoreszenzmikroskop sein. Leider ist der Effekt der Photobleichung noch zu unerforscht, um solche Vermutungen bestätigen zu können. Durch die vielen zum Einsatz kommenden Geräteteile erfordert diese Methode der Zellgewinnung aus Kulturen zusätzlich einen höheren Versuchsdurchführungs- und Wartungsaufwand. Auch die Abschätzung des nötigen Zeitaufwandes für die jeweilige Verdampfung erweist sich als eher schwierig, da der runde Glaskolben keine Skalierung besitzt und der anzulegende Vakuumdruck variierbar ist.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die hier angewandte Filtrationsmethode das geeignetste und effizienteste Verfahren zur Isolation der CBDB1-Zellen aus dem Kulturmedium darstellt. Die auf diese Weise gewonnenen Zellen können u.a. zur Isolierung bestimmter Zellmembranbestandteile, wie den Dehalogenasen oder für weitere proteomische Untersuchungen verwendet werden. Auch für die Durchführung von Enzymaktivitätstest werden oft größere Zellmengen benötigt. Die Aufkonzentrierungsmethode kann außerdem angewandt werden, um Zellen für die DNA-Isolierung zu gewinnen.

4.3 Einschätzung der einzelnen Optimierungsschritte zur Etablierung der qPCR-Methodik

Zur Bestimmung der optimalen Anlagerungstemperatur der verschiedenen Primerpaare ist Folgendes zu sagen: Laut (Wu et al. 1991) liegt die Temperatur bei der die höchste Spezifität der Primer gewährleistet wird (maximale Amplifikationstemperatur) und demzufolge unspezifische Produkte weitestgehend ausgeschlossen werden, etwas oberhalb der Schmelztemperatur des Primer-*Template*-Komplexes. Die Verbindung aus Primer und *Template* ist bei dieser Temperatur nicht als stabil zu betrachten. Sobald jedoch die ersten Nukleotide durch die Polymerase zu einer vorübergehenden Verbindung aus Primer und *Template* hinzugegeben werden, kann ein stabiler Primer-*Template*-Komplex entstehen und eine Amplifikation erfolgen. Die Primeranlagerung wird von kinetischen Prozessen gesteuert. Sie ist dabei abhängig von „(...) der Rate der Primerabspaltung vom Primer-*Template*-Komplex vor der Initialisierung der Polymerase und der Rate mit welcher die Polymerase die Primer verlängert bis ein stabiler Primer-*Template*-Komplex entstanden ist“ (Wu et al. 1991). Die effektive Primeranlagerungstemperatur ist des Weiteren abhängig von der effektiven Primerlänge. Sie wird laut (Wu et al. 1991) nach Formel 3 berechnet. Wenn die Primer keine Sequenzvariabilität aufweisen, bestimmt der Primer mit dem kleineren L_n -Wert die Anlagerungstemperatur. Laut der Berechnung der L_n und T_p -Werte für die in diesem Versuchsansatz eingesetzten Primer scheint die Anlagerungstemperatur von 65°C für beide Primerpaare geeignet zu sein, was ebenfalls den Einsatz der *Touchdown*-PCR von 65°C auf 63°C bestätigt (Tab. 29).

Trotz gleicher Bedingungen hinsichtlich der Primerkonzentration und des Temperaturprogramms, wurde bei der Amplifizierung einer Standardprobe mit den Bakterienprimern ein anderer Schwellenwertzyklus detektiert, als für die Amplifizierung derselben Probe mit den DRC-Primern (Abb. 14). Dies könnte damit zusammenhängen, dass die Bindung der Primerpaare an die jeweiligen Zielsequenzen unterschiedlich effizient verläuft. Für jedes Primerpaar musste, nach der Bestimmung der optimalen Anlagerungstemperatur, die jeweilige ideale Primerkonzentration gefunden werden. Schließlich wurde der Einsatz der Bakterienprimer in einer Konzentration von 1 μM als optimal bestimmt, während 5 μM DRC-Primer verwendet wurden. Zieht man in Betracht, dass es sich bei den DRC-Primern um ein Gemisch aus verschiedenen Primern geringerer Konzentration handelt, so erscheint es auch verständlich, dass diese in einer höheren Gesamtkonzentration vorliegen sollten als die universellen Bakterienprimer. Denn so kann jede vorliegende Art der DRC gleichermaßen amplifiziert werden und

Limitierungen einer Primersequenz führen nicht zur Unterschätzung einer Art. Es ist anzunehmen, dass die bei hoher Zyklenzahl gebildeten unspezifischen Produkte auf den zunehmenden Verbrauch der Primer und PCR-Reagenzien und die Anhäufung von entstehenden DNA-Fragmenten in späteren Zyklen zurückzuführen sind (Wong et al. 2005).

Die Tatsache, dass unverdünnte DNA-Proben schlechter amplifiziert werden, kann wie folgt erklärt werden. Koextrahierte Bestandteile wie Huminsäuren, Schwermetalle und Lösemittel aus den Extraktionssätzen können die Amplifikation der DNA behindern (Wilson 1997). Die dabei ablaufenden Prozesse sind noch weitestgehend unerforscht. Es wird angenommen, dass bestimmte Komponenten aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften oder strukturellen Gestalt so mit der DNA oder Polymerase wechselwirken, dass eine effiziente Amplifizierung unterbunden wird (Radstrom et al. 2004). Die Verdünnung der DNA-Extrakte mit ddH₂O scheint diesen Effekt zu minimieren, weil die Inhibitoren danach in weniger inhibitorischen Konzentrationen vorliegen. Der *Template*-DNA-Gehalt wird dabei zwar ebenfalls reduziert, dies spielt für die Quantifizierung des relativen Anteils an DRC-Kopien zur Gesamtbakterien-zahl jedoch keine Rolle. Die Schwankungen des relativen Anteils der DRC in den CBDB1-Kontrollen aus Experiment 1, lassen darauf schließen, dass in diesem qPCR-Lauf bei DNA-Gehalten kleiner der Größenordnung 10³ Kopien je µl einer Probe, die ermittelte Kopienzahl an DRC tendenziell unter- für Proben größer 10³ Kopien je µl überschätzt wurde. Dies ist auf eine schlechte Amplifikationseffizienz der Primer zurückzuführen. Die anhand der Standardproben ermittelte Standardkurve liegt nur um die 10³ Kopien je µl im theoretischen Idealbereich.

$$T_p = 22 + 1,46 * L_n \quad T_p = \text{effektive Primeranlagerungstemperatur}$$

$$L_n = 2 [G \text{ or } C] + [A \text{ or } T] \quad L_n = \text{effektive Länge der Primer}$$

Formel 3: zur Berechnung der effektiven Primeranlagerungstemperatur

Tab. 29: effektive Primerlänge und Anlagerungstemperatur der Primer

Primer	L _n [bp]	T _p [°C]
Dehal Fa	29/30	64-66
Dehal R	25/26	59-60
341 f	29	64
534 r	31	67

4.4 Einschätzung der Anwendbarkeit der etablierten qPCR-Methodik zur Bestimmung des relativen Gehaltes an DRC

Die erzielten Resultate aus Experiment 1 und Experiment 2 zeigen, dass das im Rahmen dieser Arbeit etablierte Verfahren zur Bestimmung der Anzahl an DRC in Sedimenten reproduzierbar angewendet werden kann. Die bereits durchgeführten Untersuchungen demonstrieren außerdem die weite Verbreitung der DRC in den verschiedensten Erdteilen und Bodentiefen.

Die entwickelte qPCR-Methode stellt somit ein geeignetes molekulares Werkzeug zur strukturellen Untersuchung der mikrobiellen Gemeinschaften in Mischkulturen und Bodenmaterial dar. Das Verfahren ermöglicht es, eine Vielzahl unerforschter Sedimente auf ihren Gehalt an DRC zu analysieren. Durch die Klonierung und Sequenzierung der erzielten PCR-Produkte könnten die genauen 16S rDNA-Sequenzen und somit die verschiedenen Stämme der in einer Sedimentprobe gefundenen DRC bestimmt werden. Auf diese Weise ist es möglich, die Artenvielfalt der DRC aus den unterschiedlichsten Gebieten und Sedimenttiefen zu bestimmen. Zusätzlich kann mit der etablierten qPCR-Methode das Wachstum dechlorierender Anreicherungskulturen aus unbekannten Medien überwacht werden. Die Bestimmung der genauen Anzahl an DRC kann sich zur Lagebeurteilung und Überwachung von Bioremediationsprozessen in mit chlorierten Schadstoffen belasteten Gebieten als hilfreich erweisen.

Um die für die qPCR einsetzbaren Proben zu erhalten, musste die Bakterien-DNA zuvor aus den Sedimenten isoliert werden. Aufgrund der beschränkten Effizienzen der verwendeten Extraktionskits führte dies oft zu Zellverlusten und bietet Angriffsfläche für Ungenauigkeiten. Es wird angenommen, dass sich nicht jede Zell-DNA verschiedener Bakterien in gleichem Maße extrahieren lässt, dies kann wiederum zur Über- oder Unterschätzungen der eigentlichen Bakterienpopulationen in den zu untersuchenden Medien führen. Der Einfluss von Inhibitoren auf die Amplifikation der jeweiligen Proben führt ebenfalls zu einer beträchtlichen Einschränkung der Anwendbarkeit der qPCR-Methodik. Wie bereits gezeigt, minimiert eine Verdünnung des DNA-Extraktes diesen Effekt. Da die Anzahl und Stärke der Inhibitoren im DNA-Extrakt von der Zusammensetzung des jeweiligen Sedimentes abhängig ist, sollte jeder DNA-Extrakt in verschiedenen Verdünnungen in einem qPCR-Lauf eingesetzt werden, um den jeweiligen Einfluss auf die Amplifikation zu bestimmen und entsprechend darauf reagieren zu können.

Die Ergebnisse der qPCR unterliegen Schwankungen. Durch ihre Abhängigkeit von einer großen Anzahl an Faktoren reagiert die qPCR-Amplifizierung sehr sensibel auf die Änderung von Reaktionskomponenten und -bedingungen, was unter 3.2 mehrfach deutlich gezeigt wurde. So können z.B. Variationen der Anlagerungstemperatur einen Einfluss auf die Enzymleistungsfähigkeit der Polymerase, dem Bindevermögen der Primer und die Ausbildung oder das Schmelzen sekundärer Strukturen haben (Wong et al. 2005). All diese Effekte addieren sich auf und behindern den erfolgreichen Verlauf einer Amplifikationsreaktion. Die größte Fehlerquelle stellt jedoch die Person dar, welche die qPCR ansetzt. Denn selbst die genaueste Pippetiertechnik hat laut (Wong et al. 2005) einen relativen Fehler von 1%. Der Einsatz einer Standardkurve minimiert diesen Einfluss, da die Standards im selben Maß beeinflusst werden wie die Proben. Auch sollte von einem Wechsel der Reaktionskomponenten abgesehen werden.

Ein Problem, welches es zu minimieren gilt, stellt die detektierte Amplifikation in den Negativkontrollen dar. Während sie für den DRC-Ansatz vernachlässigbar gering ausfällt, sind die Werte für den Bakterienansatz beträchtlich höher. Deshalb wurden Sedimentextrakte, dessen ermittelte C_t -Werte unterhalb der Negativkontrolle eines Ansatzes lagen, nicht mit in die Auswertung einbezogen. Die Amplifizierung in den Negativkontrollen könnte auf eine Verunreinigung der einzelnen *Mastermix*-Komponenten zurückzuführen sein. Auch die Schwankungen der benötigten Zyklenzahlen für die Amplifikation zweier aufeinander folgender Standards (Tab. 28) bedürfen weiterer Untersuchungen. Die Schwankungen könnten darauf zurückzuführen sein, dass die Primerpaare unterschiedliche DNA-Kopienzahlen mit verschiedenen Wirkungsgraden amplifizieren. Bei *Template*-Mengen um die 100 Kopien pro Reaktionsansatz scheint die Amplifikation gehemmt, zwischen 10^3 und 10^4 Kopien erfolgt eine Überamplifikation und bei größeren Mengen werden wiederum mehr Zyklen benötigt, um die vorliegenden DNA-Kopien zu verzehnfachen.

Einen weiteren Schwachpunkt der etablierten qPCR-Methode, stellen die erzielten Effizienzen der DRC-Primer dar, welche teilweise unter 90 Prozent liegen. Die Stabilität und Spezifität der eingesetzten Primer sowie die Länge des zu amplifizierenden Produktes spielen hierfür eine große Rolle. Eine mögliche Erklärung für die tendenziell schlechteren Effizienzen der DRC-Primer gegenüber den Bakterien-Primern könnte sein, dass manche Basenkombinationen der degenerierten Primer weniger komplementär zu den Primerbindungsstellen der PCR-Standards sind und demzufolge nur ein Teil der degenerierten Primer tatsächlich an die Standards anlagert. Die nicht perfekt an den Standard passenden Primer sind jedoch für die Amplifikation der unbekannten DRC

ebenfalls von Bedeutung. Da die Amplifikationseffizienzen jedoch anhand der Standards berechnet werden, könnte dies einen möglichen Grund für die geringeren Effizienzen darstellen.

Des Weiteren erweist sich die Interpretation der Schmelzkurven von den gebildeten qPCR-Produkten der Sedimentextrakte als problematisch. Während die Schmelzkurven der Standards und der DNA-Extrakte aus CBDB1-Reinkulturen einen klaren Peak aufweisen, haben die Schmelzkurven der Sedimente untypische Formen, wie langsam ansteigende Graphen oder einen zweiten Peak bei niedrigeren Schmelztemperaturen. Fraglich ist nun, ob dies auf die Bildung von Primerdimeren oder unspezifische Produkte zurückzuführen ist. Die Mehrfachpeaks könnten auch darauf zurückzuführen sein, dass für jedes Sedimentextrakt auf Grund der degenerierten Primer unterschiedliche PCR-Produkte mit ähnlichen aber nicht identischen Schmelztemperaturen entstehen. Dies wäre auch eine mögliche Erklärung für die nahezu identischen Schmelzkurven in den Doppelansätzen eines Sedimentes, denn in einem Sedimentextrakt können sich DNA-Kopien verschiedener Stämme der DRC befinden. Für die ungewöhnlichen Schmelzkurven der PCR-Produkte welche mit den universellen Bakterienprimern amplifiziert wurden, würde dies jedoch keine mögliche Begründung darstellen.

4.5 Gegenüberstellung der in dieser Arbeit etablierten und modifizierten Detektions- und Quantifizierungsverfahren

Wie unter 4.1 und 4.3 gezeigt, sind sowohl die modifizierte fluoreszenzmikroskopische als auch die etablierte qPCR-Methode zur Detektion und Quantifizierung anaerober Bakterien einsetzbar. Beide Ansätze beruhen auf der Ausnutzung des Prinzips der Fluoreszenz und bedienen sich des Farbstoffes SYBR[®]Green I, welcher jedoch den Nachteil hat, dass er unspezifisch an jegliche doppelsträngige DNA bindet. Bei der qPCR kann mit Hilfe einer Schmelzkurvenanalyse oder Agarosegelelektrophorese die Spezifität überprüft werden. Bei Anwendung des mikroskopischen Verfahrens ist die Spezifität jedoch nur anhand der Größe und Form der aufgenommenen Bakterien abschätzbar und deshalb nicht immer hundertprozentig festzustellen. Während mit der Methodik der Fluoreszenzmikroskopie in relativ kurzer Zeit (etwa 20 Minuten) die Zellkonzentration einer Kultur bestimmt werden kann, erlaubt die qPCR eine Parallelbestimmung mehrerer Proben in einem Lauf, dies ist jedoch auch mit einem höheren Arbeits- und Geräteaufwand verbunden. Mit der Aufnahme einer Schmelzkurve sowie den Vorbereitungsmaßnahmen vergehen etwa

3 Stunden bis zum Erhalt der Werte. Neben einer höheren Durchsatzrate hat die qPCR zusätzlich den Vorteil, dass die Quantifizierung über einen größeren linearen Dynamikbereich (9 Zehnerpotenzen) erfolgt. Es können theoretisch 10 bis 10^{10} DNA-Kopien pro Reaktionsansatz detektiert werden, was wiederum auf eine hohe Sensitivität schließen lässt. Bei der Zählung mit dem Mikroskop werden verlässliche Zellkonzentrationen erst ab einer Mindestkonzentration von ca. 1000 Zellen pro μl verlässlich detektiert. Für die qPCR-Untersuchungen ist nur eine *Template*-Menge von 1 μl erforderlich, wohingegen 20 μl Kultur zur mikroskopischen Analyse gebraucht werden. Diese können dafür direkt verwendet werden, während die Zählung von Bakterienarten mittels DNA-basierender Methoden immer abhängig vom Wirkungsgrad der Zelllyse und der sich anschließenden Reinigungsschritte ist. Für diese DNA-Extraktion wird in etwa 1 g Sediment benötigt. Einen Nachteil der fluoreszenzmikroskopischen Methode stellt der Effekt der Photobleichung dar. Durch die ausgefeilte Technik der heute kommerziell erwerbbaaren qPCR-Geräte spielt er bei dem hier etablierten qPCR-Verfahren eher eine untergeordnete Rolle. Der Einfluss von Inhibitoren auf den Prozess der Amplifikation der DNA-Extrakte aus Mischkulturen darf hingegen nicht unterschätzt werden. Wie die hohe mittlere Standardabweichung der Fluoreszenzmikroskopie verdeutlicht, ist diese Methode leicht anfällig für Fehler und auch die erzielten DNA-Konzentrationen der qPCR-Methode unterliegen auf Grund ihrer Abhängigkeit von einer Reihe von Reaktionsbedingungen und -faktoren gewissen Schwankungen. Wenn all die bisher genannten Einflussfaktoren bei der Durchführung der jeweiligen Verfahren beachtet werden und stets eine kritische Auseinandersetzung mit den erzielten Resultaten erfolgt, sind beide Verfahren innerhalb ihrer Grenzen in der Lage, reproduzierbare, verlässliche Ergebnisse zur Quantifizierung anaerober Bakterien zu produzieren.

5 Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit wurden verschiedene Verfahren zur Detektion und Quantifizierung anaerober Mikroorganismen etabliert, optimiert und anschließend hinsichtlich ihrer Anwendbarkeit, Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit miteinander verglichen. Zum einen wurde die Methode der mikroskopischen Zellzählung mit dem Epifluoreszenzmikroskop optimiert, das Sichtfeld wurde erweitert und das Verfahren zur Immobilisierung der Zellen auf den Objektträgern verbessert. Dazu wurde die Agarosekonzentration von 2% auf 1,67% verringert, die Objektträger wurden vor dem Aufbringen der Agaroseschicht im Wasserbad auf 80°C erhitzt und die fertigen Objektträger unter der Sterilbank ohne Luftzufuhr für etwa 48 Stunden getrocknet. Nach der Bestimmung der Standardabweichung von ca. 27 % für das mikroskopische Zellzählverfahren, wurde die Fehleranfälligkeit der Methode eingeschätzt. Die mikroskopische Zählung ist zügig und ohne großen Aufwand durchführbar, sie erlaubt demzufolge eine rasche Schätzung der Zellzahlen in flüssigen Reinkulturen. Mittels des etablierten Zählverfahrens mit dem Fluoreszenzmikroskop wurden verschiedene Trennungsvorgänge auf ihr Potential zur Zellaufkonzentrierung anaerober Bakterien aus Reinkulturen untersucht. Zentrifugations- und Filtrationsverfahren, sowie die Vakuumdestillation kamen hierfür zum Einsatz. Im Rahmen dieser Untersuchungen, wurde das Zellrückhaltevermögen verschiedener Spritzenvorsatzfilter erforscht. Hierfür wurden verschiedene Materialien und unterschiedliche Porengrößen getestet. Die Filtration mittels der PES 0,1, PES 0,2 und CA 0,2 Filter hat sich schließlich als die effizienteste Methode zur Gewinnung der CBDB1-Zellen erwiesen. Des Weiteren wurde zusätzlich zur mikroskopischen Zellzählung eine qPCR-Methode zur Quantifizierung der Anzahl der DRC in Sedimentproben etabliert. Diese Methode ist zwar um einiges aufwendiger, lässt aber im Gegenzug auch eine Bestimmung des relativen Vorhandenseins der DRC-Zahl in Mischkulturen und Sedimenten zu. Obwohl diese qPCR-Methode die Detektion verschiedener *Dehalococcoides* Stämme in Meeressedimenten erlaubt, ist es nicht möglich, eine Vorhersage über die physiologischen Eigenschaften dieser Bakterien anhand der Detektion ihrer 16S rRNA Gene zu treffen. Die Aufklärung über die genauen Funktionen der jeweils in den Genen der verschiedenen Stämme kodierten reduktiven Dehalogenasen und die Weiterentwicklung der qPCR-Versuchsansätze, welche auf diese Gene abzielen (Ritalahti et al. 2006), (Holmes et al. 2006), könnte zur Beschreibung der Verteilung und der potentiellen Stoffwechseleigenschaften der DRC mit noch besserer Genauigkeit hilfreich sein.

Summary

In this study, different procedures for the detection and quantification of anaerobic microorganisms were established, optimised and compared in regards to their applicability, reliability and reproducibility. Initially, the microscopic counting of cells via epifluorescence microscopy was optimised. These optimizations included the enlargement of the visual field to enable better visualization of 'small' cells, and further the method for the immobilisation of the cells on agarose covered glass slide was improved by minimising the percentage of agarose from 2 % to 1.67 %, heating the glass slides up to 80°C in a water bath before applying the agarose solution and letting the slides dry without any airflow under a sterile cabinet for 48 hours. Standard deviations were determined and thereby the error-proneness could be estimated, and it was determined to be on average 27 %. The microscopic counting approach was deemed useful in that it could be conducted quickly and with little effort, and therefore enables fast estimations of the cell numbers in the liquid cultures examined. Using this newly optimized cell counting procedure, different approaches were tested for their potential to concentrate anaerobic bacterial cells from a pure culture of *Dehalococcoides* strain CBDB1, which has previously proven difficult to concentrate via standard centrifugation procedures due to their small size and apparent delicate cell structure. Centrifugation, filtration and vacuum distillation procedures were tested for this purpose. Within these investigations, particular focus on testing the cell retention ability of various syringe filters and filter membrane materials, as well as pore sizes were tested. In the end, the filtration method using the PES 0.1, PES 0.2 and CA 0.2 filters emerged as the most efficient method to recover CBDB1 cells from cultures. Finally and in addition to the microscopic cell counting procedures, a quantitative PCR (qPCR) method for the quantification of *Dehalococcoides*-related *Chloroflexi* from sediment samples has been established. This method enables the determination of the relative abundance of the *Dehalococcoides*-related *Chloroflexi*, not only in pure, but also in mixed cultures and in environmental samples such as sediments. With this method we found evidence for their widespread distribution in the marine subsurface. Although this enabled the detection of various sequences related to known organohalide-respiring *Dehalococcoides*, it is not possible to make assumptions about the in situ physiological properties of such bacteria based upon the detection of 16S rRNA genes. Future work targeting genes that encode for reductive dehalogenases (enzymes that enable organohalide respiration in known *Dehalococcoides* and some related species) with qPCR approaches (Ritalahti et al. 2006; Holmes et al. 2006) may help describe the distribution and potential metabolic properties of the *Dehalococcoides*-related *Chloroflexi* with even greater precision.

Anlagen

Anhang 1

Übersetzung:

Protokoll zur Zellgewinnung: (Original aus dem Englischen von Kelly Fletcher)

(In diesem Fall 300 ml Kulturmedium)

1. Fülle 48 ml einer Kultur im Anaerobzelt in ein anoxisches 50 ml Falcongefäß. Wiederhole diesen Vorgang für bis zu 6 weitere Falcongefäße. Schließe die Gefäße im Anaerobzelt.
2. Zentrifugiere die Falcongefäße für 60 min bei 15°C und 3600 xg.
3. Überführe die Gefäße in das Anaerobzelt ohne das Pellet zu zerstören.
4. Im Anaerobzelt, Verwerfe ungefähr 43 ml des Überstandes von allen Gefäßen (im Anaerobzelt).
5. Löse die Pellets durch vortexen und füge sie in einem 50 oder 15 ml Falcongefäß zusammen (im Anaerobzelt).
6. Zentrifugiere abermals für 60 min bei 15°C und 3600 x g.
7. Überführe das Falcongefäß in das Anaerobzelt und verwerfe den Überstand, sodass 1-2 ml übrig bleiben.
8. Löse das Pellet durch vortexen und überführe es in ein oder zwei 1,5 ml Eppendorfgefäße (im Anaerobzelt).
9. Zentrifugiere das Eppendorfgefäß für 30 min bei 8000 x g (im Anaerobzelt).
10. Im Fall von zwei Eppendorfgefäßen, verwerfe einen Großteil des Überstandes, resuspendiere die Pellets, füge sie zusammen und zentrifugiere für 15 min bei 8000 x g.
11. Verwerfe den gesamten Überstand und lagere das Pellet bei -80°C.

Anhang 2

Schmelzkurven des qPCR-Laufes zur Untersuchung des Verhältnisses an DRC in Sedimenten Experiment 1

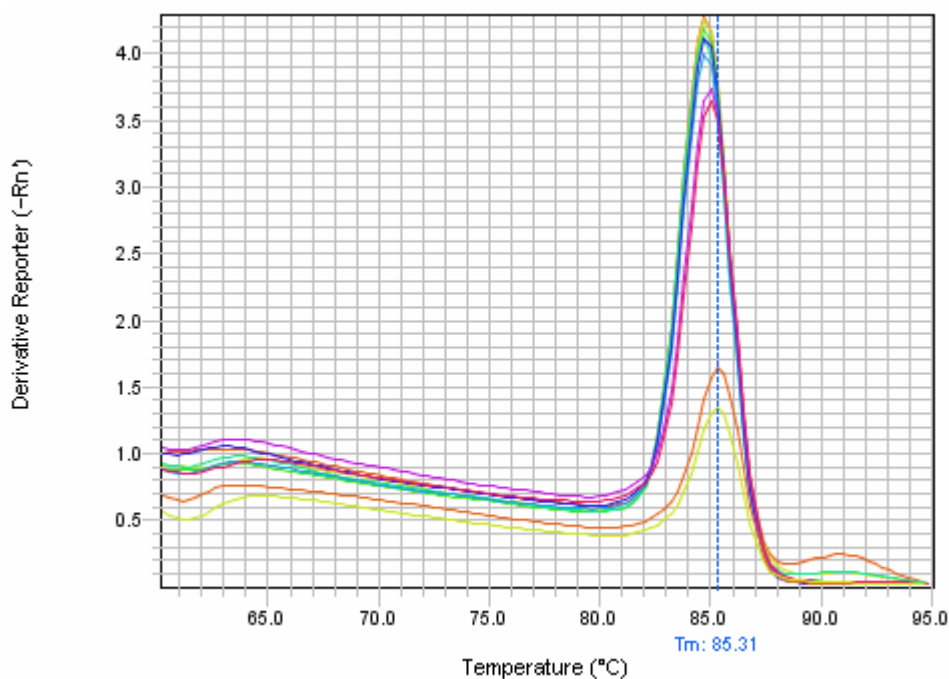


Abb. 27: Schmelzkurven der Standardproben amplifiziert mit den DRC-Primern jeweils im Doppelansatz

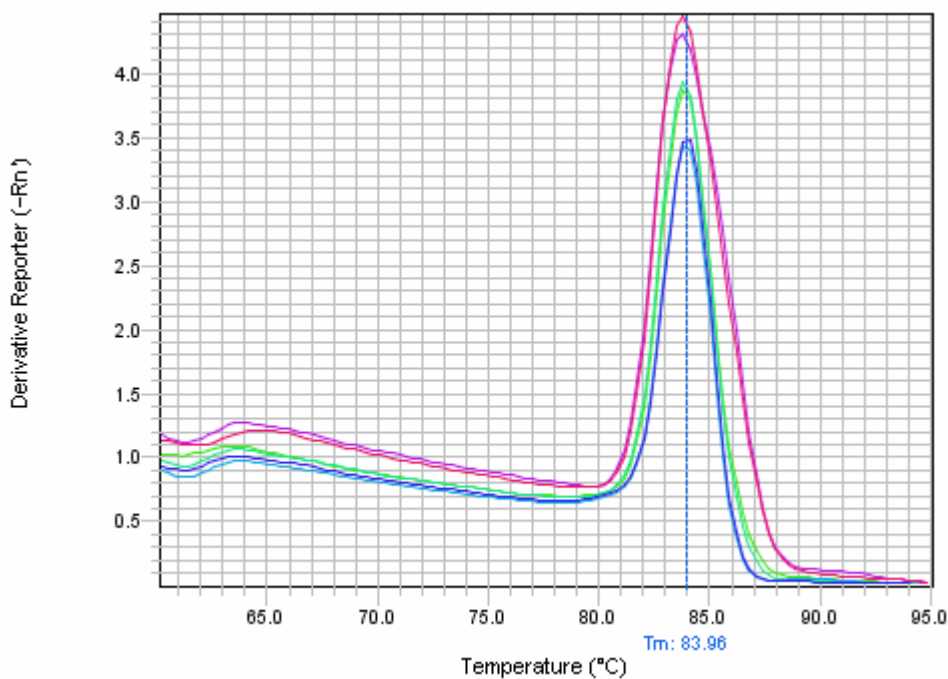


Abb. 28: Schmelzkurven der CBDB1-Kontrollen CBDB1 a-c amplifiziert mit den DRC-Primern jeweils im Doppelansatz

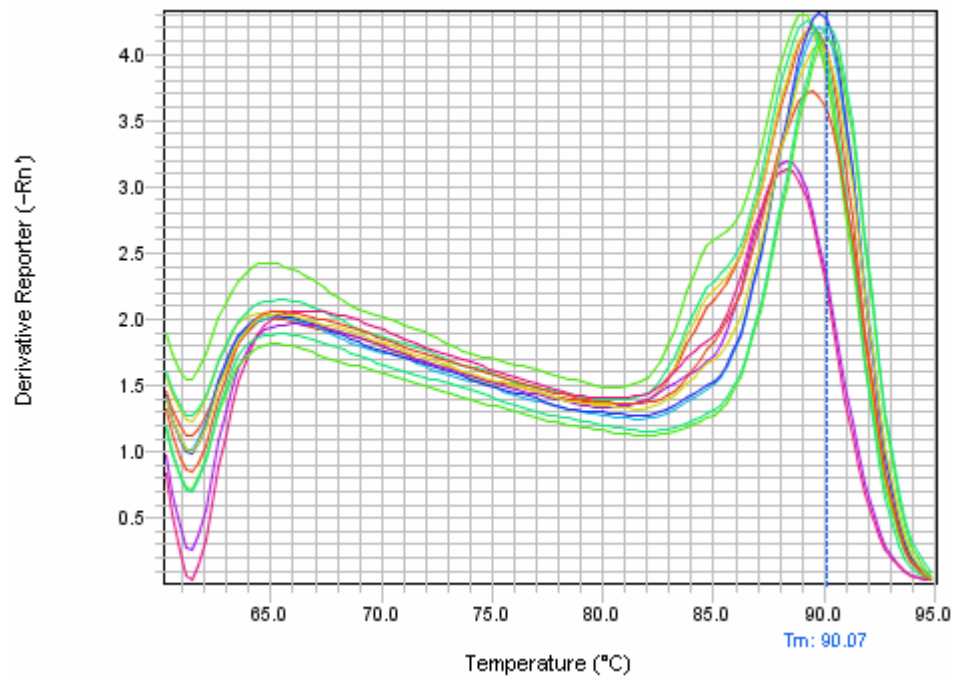


Abb. 29: Schmelzkurven der Nordsee Proben 7,8,9,13,15 und 18 amplifiziert mit den DRC-Primern jeweils im Doppelansatz

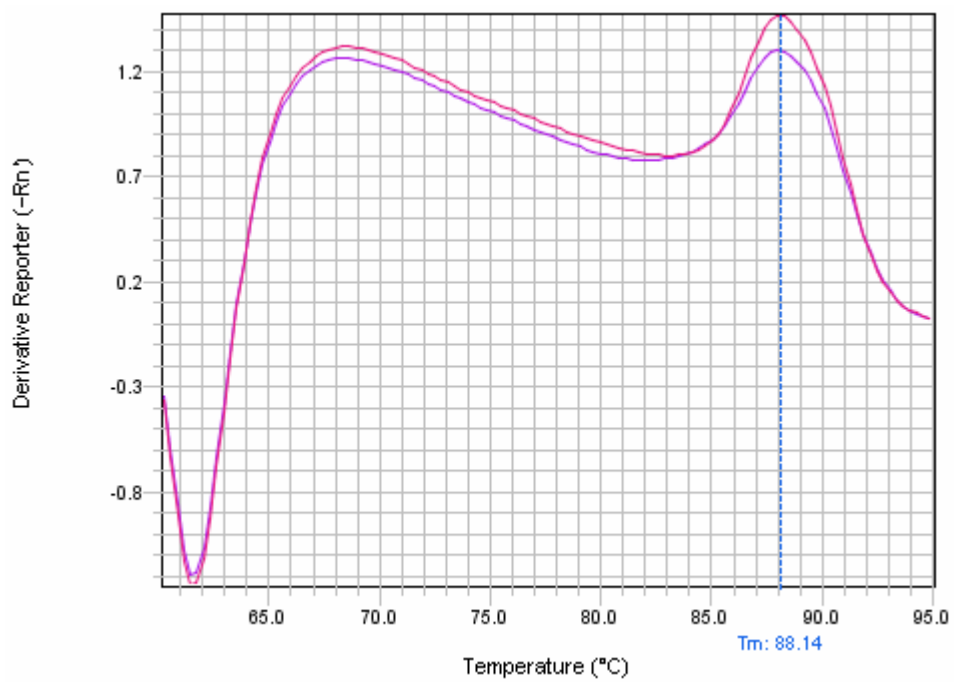


Abb. 30: Schmelzkurven der Neapel Probe amplifiziert mit den DRC-Primern jeweils im Doppelansatz

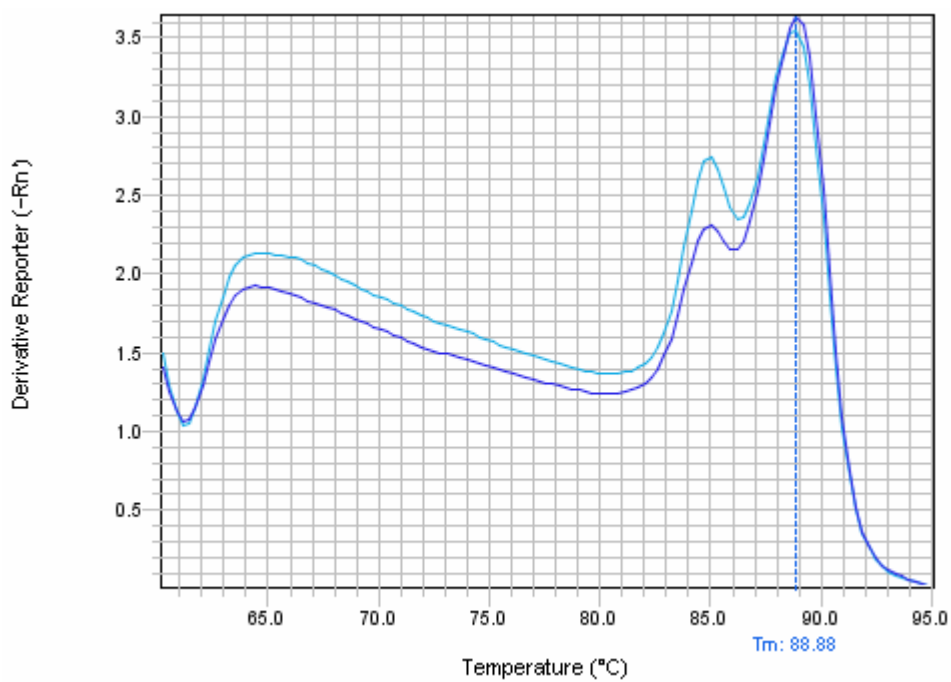


Abb. 31: Schmelzkurven der Chile oben Probe amplifiziert mit den DRC-Primern jeweils im Doppelansatz

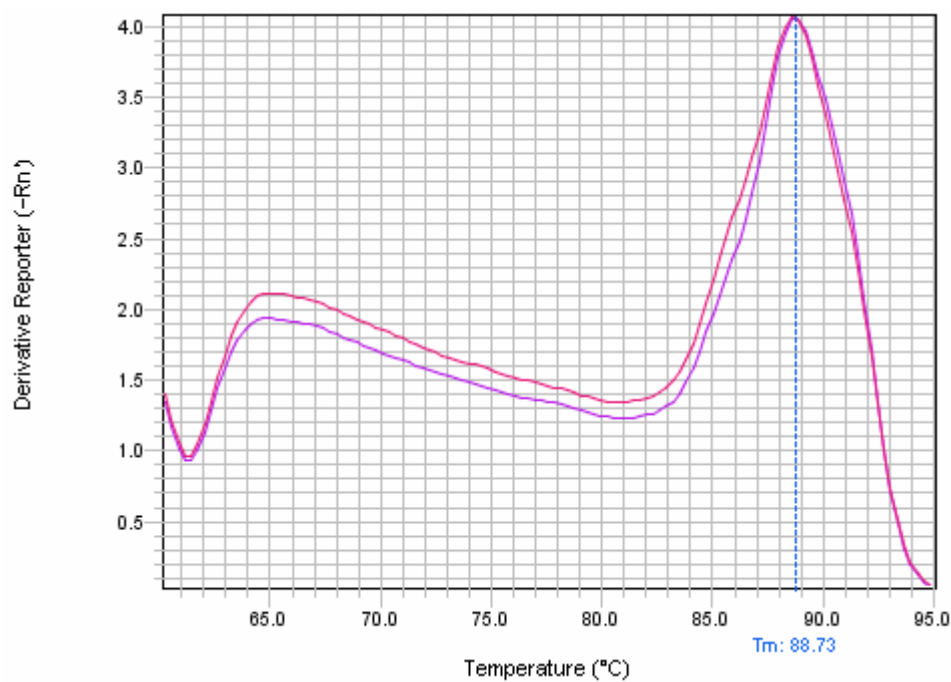


Abb. 32: Schmelzkurven der Chile unten Probe amplifiziert mit den DRC-Primern jeweils im Doppelansatz

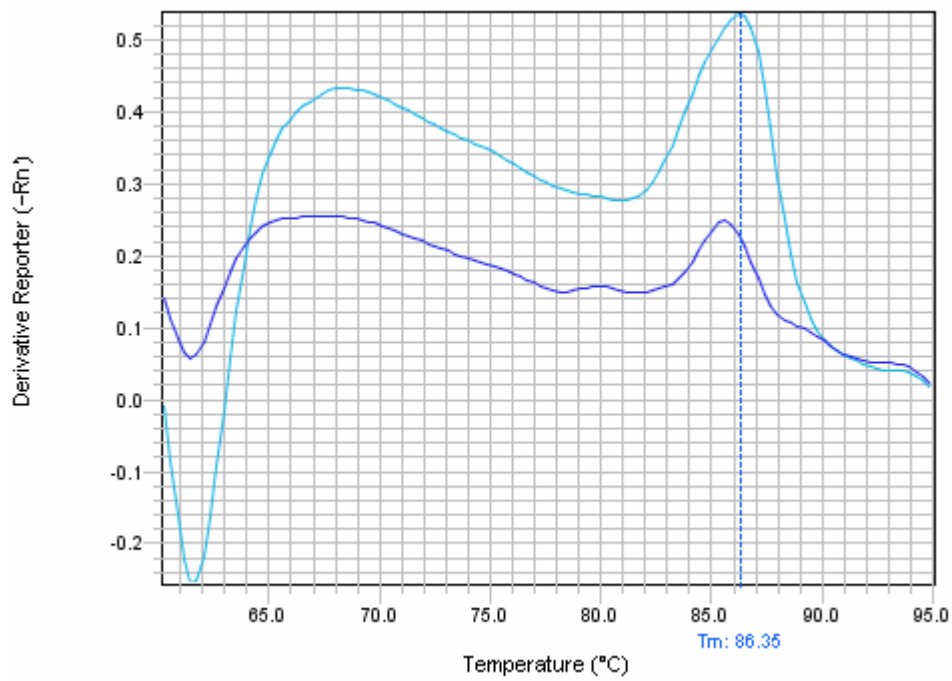


Abb. 33: Schmelzkurven der Irland 17 Probe amplifiziert mit den DRC-Primern jeweils im Doppelansatz

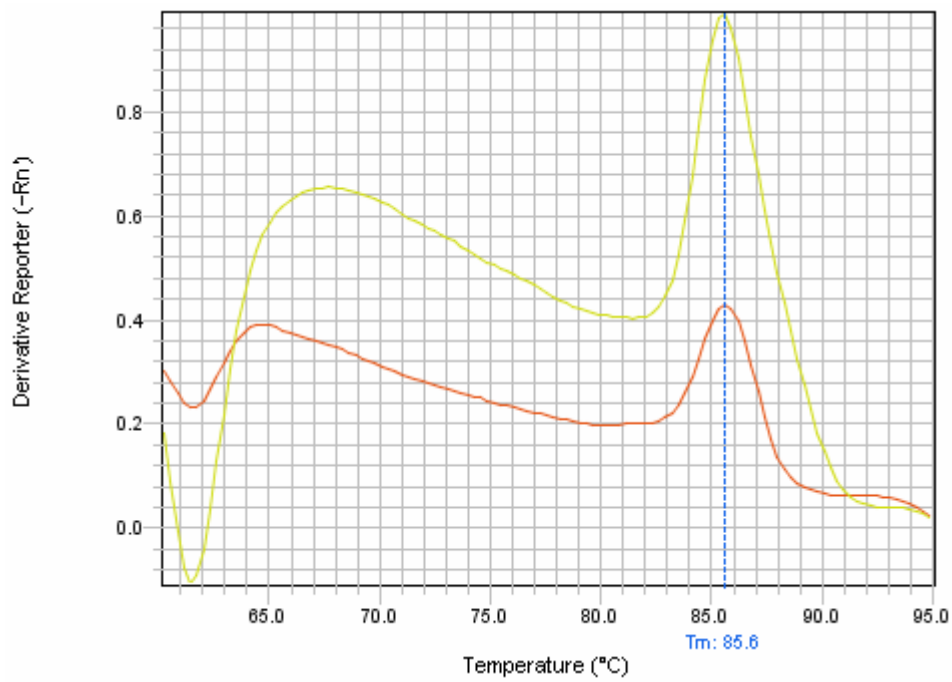


Abb. 34: Schmelzkurven der Irland 18 Probe amplifiziert mit den DRC-Primern jeweils im Doppelansatz

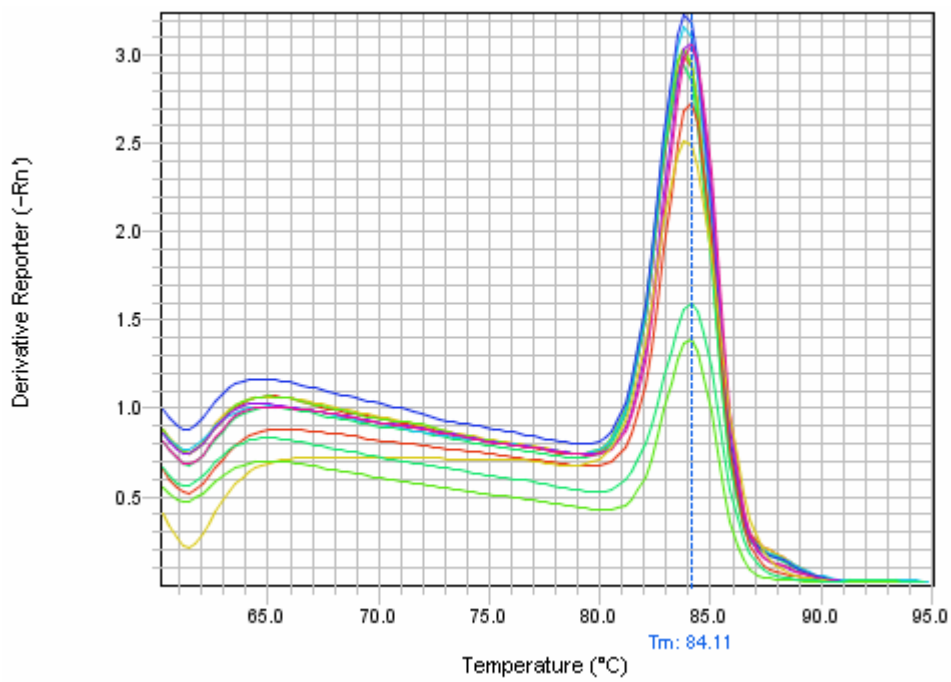


Abb. 35: Schmelzkurven der Standardproben amplifiziert mit den Bakterien Primern jeweils im Doppelansatz

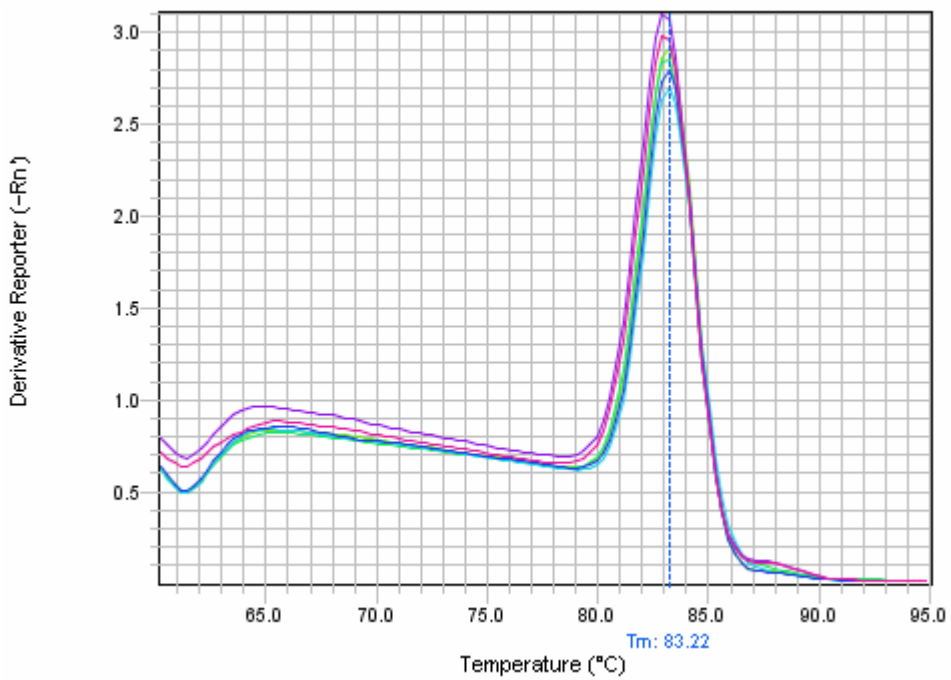


Abb. 36: Schmelzkurven der CBDB1-Kontrollen CBDB1 a-c amplifiziert mit den Bakterien Primern jeweils im Doppelansatz

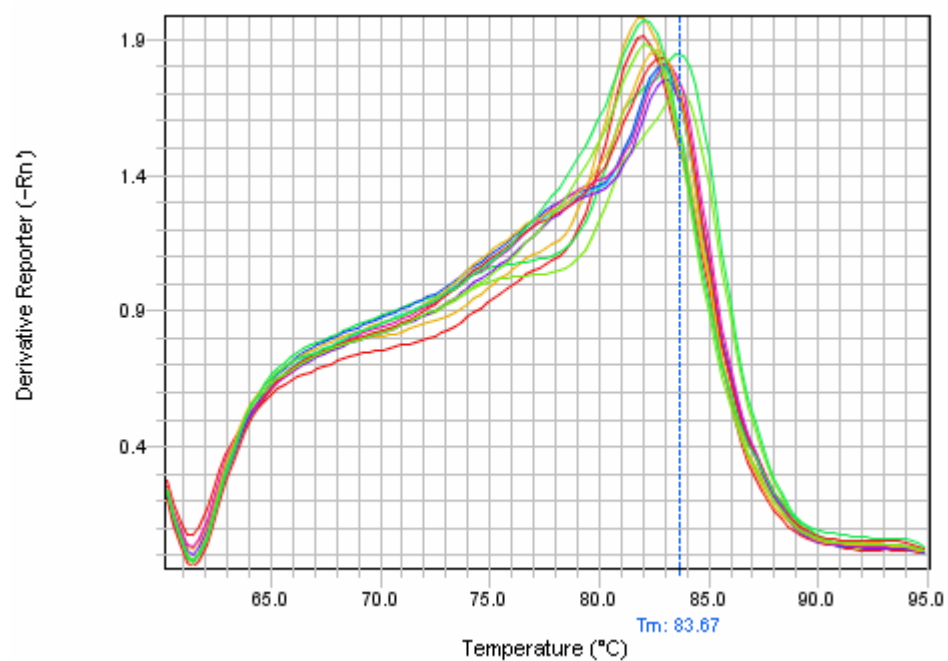


Abb. 37: Schmelzkurven der Nordsee Proben 7,8,9,13,15 und 18 amplifiziert mit den Bakterien Primern jeweils im Doppelansatz

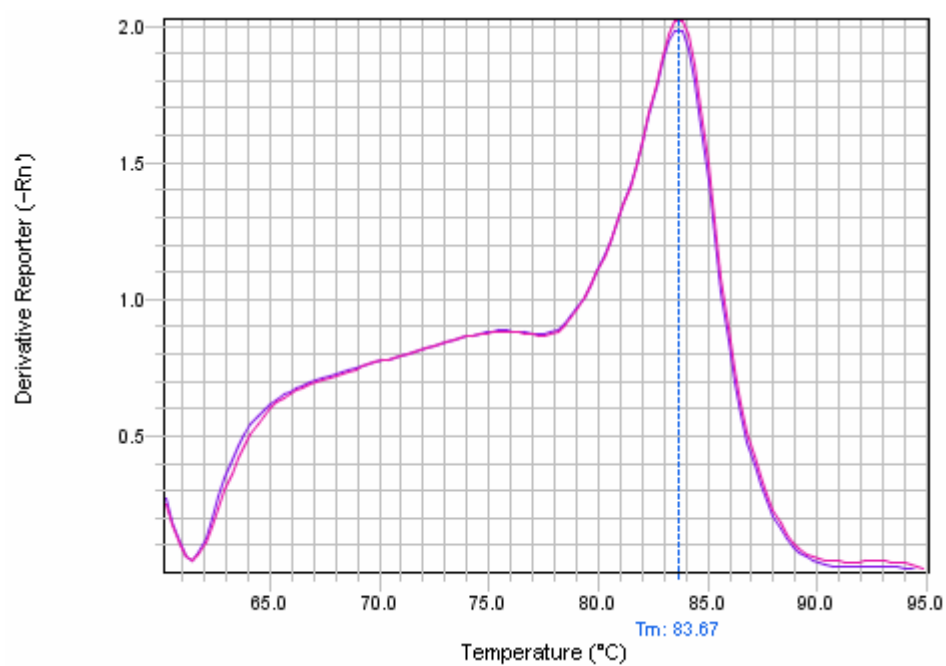


Abb. 38: Schmelzkurven der Neapel Probe amplifiziert mit den Bakterien Primern jeweils im Doppelansatz

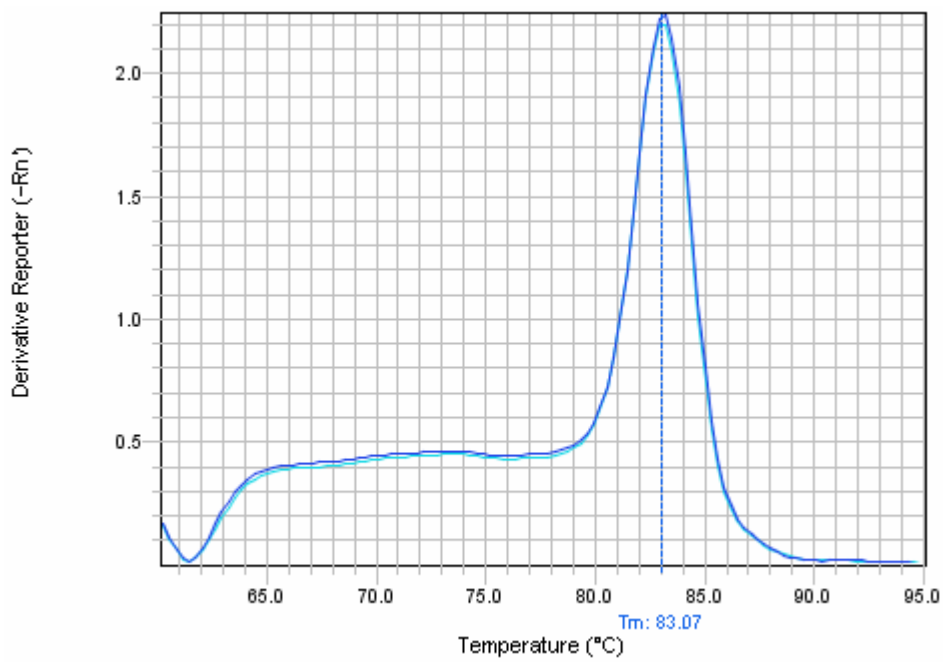


Abb. 39: Schmelzkurven der Chile oben Probe amplifiziert mit den Bakterien Primern jeweils im Doppelansatz

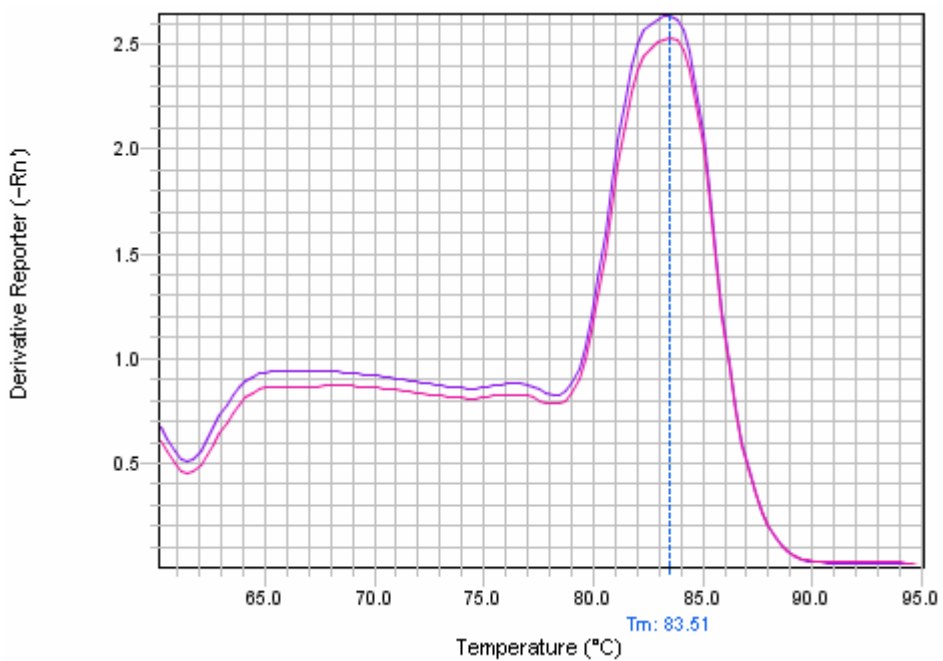


Abb. 40: Schmelzkurven der Chile unten Probe amplifiziert mit den Bakterien Primern jeweils im Doppelansatz

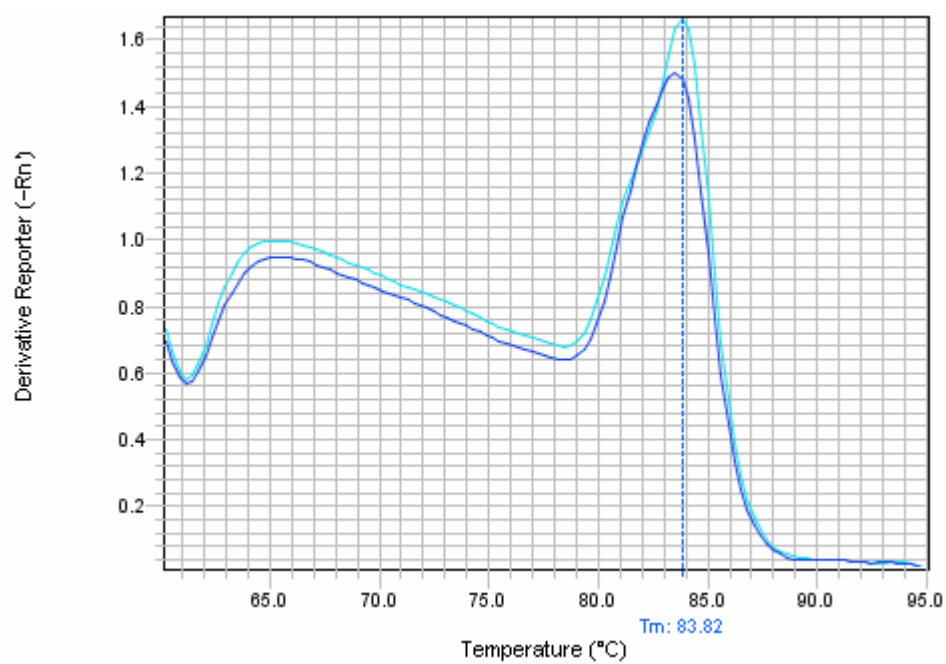


Abb. 41: Schmelzkurven der Irland 17 Probe amplifiziert mit den Bakterien Primern jeweils im Doppelansatz

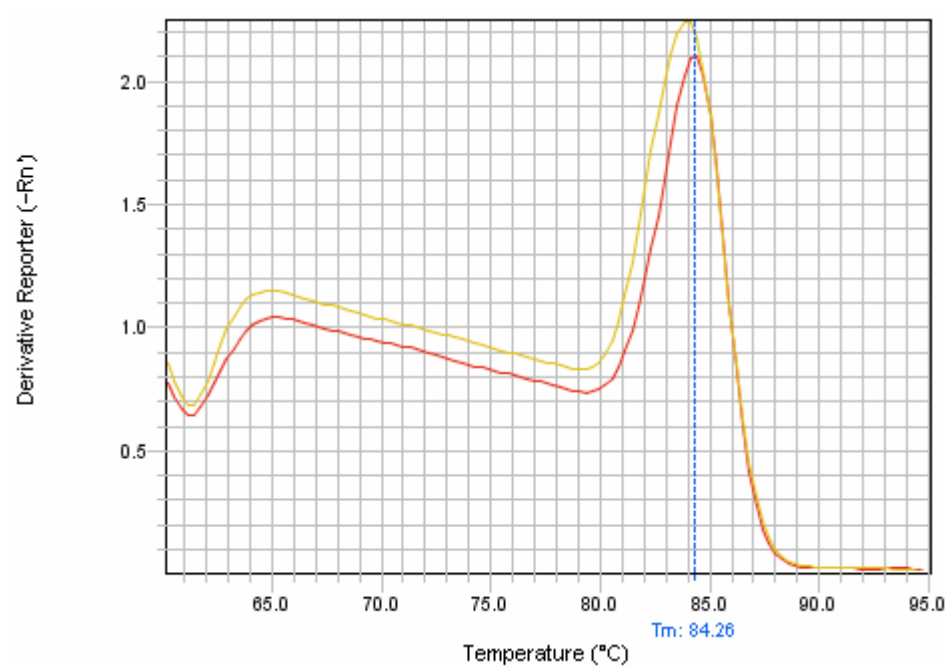


Abb. 42: Schmelzkurven der Irland 18 Probe amplifiziert mit den Bakterien Primern jeweils im Doppelansatz

Literaturverzeichnis

Paper

- Adrian, L., S. K. Hansen, J. M. Fung, H. Gorisch and S. H. Zinder (2007). "Growth of *Dehalococcoides* strains with chlorophenols as electron acceptors." Environmental Science & Technology **41**(7): 2318-2323.
- Adrian, L., U. Szewzyk, J. Wecke and H. Gorisch (2000). "Bacterial dehalorespiration with chlorinated benzenes." Nature **408**(6812): 580-583.
- Ahsanul Islam, M., E. A. Edwards and R. Mahadevan (2010). "Characterizing the metabolism of *Dehalococcoides* with a constraint-based model." PLoS Comput Biol **6**(8): e1000887.
- Don, R. H., P. T. Cox, B. J. Wainwright, K. Baker and J. S. Mattick (1991). "Touchdown PCR to circumvent spurious priming during gene amplification." Nucleic Acids Research **19**(14): 4008-4008.
- Edgar, R. C. (2004). "MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput." Nucleic Acids Research **32**(5): 1792-1797.
- Holmes, V. F., J. Z. He, P. K. H. Lee and L. Alvarez-Cohen (2006). "Discrimination of multiple *Dehalococcoides* strains in a trichloroethene enrichment by quantification of their reductive dehalogenase genes." Applied and Environmental Microbiology **72**(9): 5877-5883.
- Kube, M., A. Beck, S. H. Zinder, H. Kuhl, R. Reinhardt and L. Adrian (2005). "Genome sequence of the chlorinated compound respiring bacterium *Dehalococcoides* species strain CBDB1." Nature Biotechnology **23**(10): 1269-1273.
- Ludwig, W., O. Strunk, R. Westram, L. Richter, H. Meier, Yadhukumar, A. Buchner, T. Lai, S. Steppi, G. Jobb, W. Forster, I. Brettske, S. Gerber, A. W. Ginhart, O. Gross, S. Grumann, S. Hermann, R. Jost, A. Konig, T. Liss, R. Lussmann, M. May, B. Nonhoff, B. Reichel, R. Strehlow, A. Stamatakis, N. Stuckmann, A. Vilbig, M. Lenke, T. Ludwig, A. Bode and K. H. Schleifer (2004). "ARB: a software environment for sequence data." Nucleic Acids Research **32**(4): 1363-1371.
- Major, D. W., M. L. McMaster, E. E. Cox, E. A. Edwards, S. M. Dworatzek, E. R. Hendrickson, M. G. Starr, J. A. Payne and L. W. Buonamici (2002). "Field demonstration of successful bioaugmentation to achieve dechlorination of tetrachloroethene to ethene." Environmental Science & Technology **36**(23): 5106-5116.
- Maymo-Gatell, X., Y. T. Chien, J. M. Gossett and S. H. Zinder (1997). "Isolation of a bacterium that reductively dechlorinates tetrachloroethene to ethene." Science **276**(5318): 1568-1571.
- Muyzer, G., Hottentrager, S., et al. (1996). „Denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rDNA. A new molecular approach to analyze the genetic diversity of mixed microbial communities". Molecular Microbial Ecology Manual, Kluwer Academic Publishing, Dordrecht, 3.4.4.1–3.4.4.22

- Radstrom, P., R. Knutsson, P. Wolffs, M. Lovenklev and C. Lofstrom (2004). "Pre-PCR processing - Strategies to generate PCR-compatible samples." Molecular Biotechnology **26**(2): 133-146.
- Ritalahti, K. M., B. K. Amos, Y. Sung, Q. Z. Wu, S. S. Koenigsberg and F. E. Löffler (2006). "Quantitative PCR targeting 16S rRNA and reductive dehalogenase genes simultaneously monitors multiple *Dehalococcoides* strains." Applied and Environmental Microbiology **72**(4): 2765-2774.
- Song, L. L., E. J. Hennink, I. T. Young and H. J. Tanke (1995). "Photobleaching kinetics of fluorescein in quantitative fluorescence microscopy." Biophysical Journal **68**(6): 2588-2600.
- Tas, N., M. H. A. van Eekert, G. Schraa, J. Z. Zhou, W. M. de Vos and H. Smidt (2009). "Tracking Functional Guilds: '*Dehalococcoides*' spp. in European River Basins Contaminated with Hexachlorobenzene." Applied and Environmental Microbiology **75**(14): 4696-4704.
- Tas, N.; M.H.A. van Eekert, W. M. de Vos and H. Schmidt. (2010). "The little bacteria that can –diversity, genomics and ecophysiology of '*Dehalococcoides*' spp. in contaminated environments." Microbial Biotechnology **3**(4): 389-402.
- Tschech, A., Pfennig, N. 1984. Growth yield increase linked to caffeate reduction in *Acetobacterium woodii*. Archives of Microbiology. **137**(1):163-167.
- Wilson, I. G. (1997). "Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification." Applied and Environmental Microbiology **63**(10): 3741-3751.
- Wong, M. L. and J. F. Medrano (2005). "Real-time PCR for mRNA quantitation." Biotechniques **39**(1): 75-85.
- Wu, D. Y., L. Ugozzoli, B. K. Pal, J. Qian and R. B. Wallace (1991). "The effect of temperature and oligonucleotide primer length on the specificity and efficiency of amplification by the polymerase chain-reaction." DNA and Cell Biology **10**(3): 233-238.

Bücher/ Broschüren

- Knippers, Rolf: Molekulare Genetik.-9.Aufl.-Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 2006, S.28f
- Lakowicz Joseph R.: Principles of Fluorescence Spectroscopy, - 2. Auflage –New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 1999, S. 1 ff,S. 15ff
- Kunz, Peter: Umwelt-Bioverfahrenstechnik.-1.Aufl.-Wiesbaden:Vieweg, 1992, S.81f
- Mikroskop Begleitheft: OPTIPHOT-2, - 1. Auflage- Düsseldorf: Nikon GmbH, 1991, S.3
- Robenek, Horst: M.Amrein: Mikroskopie in Forschung und Praxis.-1.Aufl.-Darmstadt: GIT Verlag GmbH,1995, S.21, S.44, S.68f

QuantiTect™ SYBR® Green PCR Handbook. (08/2003). "For quatitative, real-time PCR and two-step RT-PCR" QIAGEN GmbH (Hilden,Germany).

tech note 5859 BIORAD: Sean Taylor, Michael Wakern, Greg Dijkman, Marwan Alsarraj and Marie Nguyen. (2010). "A Practical Approach to RT-qPCR-Publishing Data That Conform to the MIQE Guidlines" Bio-Rad Laboratories, Inc., CA 94547, Bulletin 5859

Widdel, F. 1980. Anaerober Abbau von Fettsäuren und Benzoessäure durch neu isolierte Bakterien. Dissertation Göttingen.

Internetquellen

ACTEW Corporation Ltd: WaterFiltrationProcesses. URL:
<http://www.actew.com.au/water2water/_lib/images/diagrams/WaterFiltrationProcesses.gif>, verfügbar am 04.03.2011

Davidson, R Stephen <davidson@citifluor.co.uk> : Mountant media for Immunofluorescence which overcome the problems of Fading. URL:
<<http://www.citifluor.co.uk>>, verfügbar am 27.2.2011

Kluczka, Sven: Vakuumdestillation. URL: <http://www.ce-des.de/files/pr_sentation_vakuudest03.pdf>, verfügbar am 04.03.2011

Köpp, Oliver: filtermaterial_gross. URL:
<http://www.koepp.de/wDeutsch/img/bilder/filtermaterial_gross.jpg>, verfügbar am 04.03.2011

Lichtscheidl, Irene K. (Universität Wien): Bauarten von Mikroskopen URL:
<http://www.univie.ac.at/mikroskopie/1_grundlagen/mikroskop/bauarten/1_bauarten.htm>, verfügbar am 04.03.2011

Molecular Probes Inc.: SYBR Green I Nucleic Acid Gel Stain. URL:
<<http://probes.invitrogen.com/media/pis/mp07567.pdf>>, verfügbar am 04.03.2011

Stephan Frings und Arnd Baumann: Vorlesungsskripte Zoophysiologie Moderne Methoden der Zellbiologie URL:
<<http://www.sinnesphysiologie.de/methoden/fluo/fluo1l.htm>>, verfügbar am 04.03.2011

Uni-Hannover: Filtration. URL: <<http://www2.tci.uni-hannover.de/pdf/diplom-chemie-grundoperationen-filtration-1.pdf>>, verfügbar am 04.03.2011

Vector Laboratories Inc.: VECTASHIELD Mounting Media for Fluorescence. URL:
<<http://www.vectorlabs.com/catalog.aspx?catID=279>>, verfügbar am 04.03.2011

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe. Stellen, die aus Quellen entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht. Diese Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Mittweida, den 05.03.2011

Josefine Müller